

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Enrichissement de protéines ubiquitinées et une nouvelle approche
protéomique pour l'identification des sites d'ubiquitination**

par
Chantal Durette

Département de Chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en Chimie

Août 2008

©Chantal Durette, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Enrichissement de protéines ubiquitinées et une nouvelle approche protéomique
pour l'identification des sites d'ubiquitination**

présenté par :
Chantal Durette

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Karen Waldron
président-rapporteur

Dr Pierre Thibault
directeur de recherche

Dr Sylvain Meloche
codirecteur

Dr Dominic Rochefort
membre du jury

Résumé

L'ubiquitination des protéines est une modification post-traductionnelle qui régule un large éventail d'événements cellulaires et plus particulièrement la dégradation par le protéasome. Son dérèglement peut entraîner plusieurs maladies notamment le cancer et des désordres inflammatoires. À ce jour, peu d'études à grande échelle chez les cellules de mammifères ont porté sur l'identification des protéines ubiquitinées et de leurs sites de modification. Ce travail propose une approche protéomique différentielle combinant une purification par affinité et l'utilisation d'une enzyme de déubiquitination (UBP) pour identifier les protéines ubiquitinées et leurs sites de modifications.

Différentes purifications par affinité ont été mises au point, soit une purification à l'aide d'une protéine liant les protéines ubiquitinées (Rad23) et une purification à l'aide d'une forme modifiée de l'ubiquitine (6xHis-ubiquitine). De plus, une approche combinant ces deux purifications a aussi été évaluée. Ces purifications ont permis d'identifier plus de 1400 protéines potentiellement ubiquitinées et 28 sites d'ubiquitination dont 6 sites sur l'ubiquitine.

L'approche protéomique différentielle consiste en la digestion avec UBP de protéines ubiquitinées enrichies comparativement à un échantillon contrôle non digéré. Par la suite, ces 2 échantillons sont digérés par la trypsine et analysés par nanoLC/LC-MS/MS par un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap. Les peptides obtenus des protéines ubiquitinées conservent un adduit diglycine caractéristique suite à la digestion tryptique. Une analyse poussée des données à l'aide d'un logiciel de détection de peptides révèle deux populations distinctes d'ions représentant les peptides contenant l'adduit diglycine ou non. La validation de l'approche a permis de retracer 3 couples peptidiques associés à un site d'ubiquitination.

Mots clés: ubiquitination, spectrométrie de masse, purification par affinité, identification de sites d'ubiquitination, protéomique.

Abstract

The ubiquitin pathway is involved in a wide range of cellular events including receptor internalization, signal transduction and proteasomal degradation. Misregulation of the later can cause many diseases such as cancer and inflammatory disorders. So far, few large-scale studies of protein ubiquitylation have been reported due to the difficulty of isolating these low abundance and rapidly degraded proteins. In this study, a differential proteomic strategy combining affinity purification and the use of a deubiquitylating enzyme (UBP) is proposed to identify ubiquitylated proteins targeted for proteasomal degradation.

Two affinity purifications methods were developed, one based on a protein binding ubiquitylated proteins (Rad23) and the other based on a modified version of ubiquitin (6xHis-ubiquitin). Combination of both purification methods was also evaluated. These purifications methods enabled the identification of more than 1400 potentially ubiquitylated proteins and 28 sites of ubiquitylation with 6 sites on ubiquitin.

A differential proteomic approach was then applied by treating half of the enriched ubiquitylated proteins with UBP. The non-treated control and the UBP-treated protein extracts were digested with trypsin and analyzed by nanoLC/LC-MS/MS on a high resolution LTQ-Orbitrap mass spectrometer. Peptide ions derived from ubiquitylated proteins comprise a miscleavage tryptic site harbouring a characteristic diglycine adduct on the lysine side chain. Comprehensive data mining and clustering analyses on peptide maps using in-house bioinformatics software were performed to characterize two distinct ion populations representing peptides containing or not the diglycine adduct. Validation of the approach enabled the identification of 3 peptide ion pairs correlated with the addition of an ubiquitylation site.

Keywords: Ubiquitylation, mass spectrometry, affinity purification, identification of ubiquitylation site, proteomic.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xvii
Remerciements.....	xx
 1. Introduction générale.....	 1
1.1. But du projet.....	2
1.2. Processus d'ubiquitination dans la cellule	3
1.2.1. Rôles biologiques	3
1.2.2. Enzymes impliquées	6
<i>1.2.2.1. Enzymes d'ubiquitination.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2.2. Enzymes de déubiquitination</i>	<i>8</i>
1.2.3. Description du système ubiquitine / protéasome.....	9
1.3. Étude des protéines ubiquitinées par spectrométrie de masse.....	12
1.3.1. Méthodes de purification des protéines ubiquitinées.....	12
<i>1.3.1.1. Utilisation d'une forme modifiée de l'ubiquitine</i>	<i>13</i>
<i>1.3.1.2. Utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine</i>	<i>15</i>
<i>1.3.1.3. Utilisation d'une protéine liant l'ubiquitine</i>	<i>15</i>
<i>1.3.1.4. Utilisation d'un domaine liant l'ubiquitine</i>	<i>16</i>
1.3.2. Méthodes de séparation	17
1.3.3. Méthodes d'identification des sites d'ubiquitination.....	18
1.4. Spectrométrie de masse.....	21
1.4.1. Ionisation par nébulisation électrostatique.....	23
1.4.2. Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap	24
1.4.3. Spectrométrie de masse en tandem	27
1.4.4. Traitement des données menant à l'identification des protéines.....	28

1.4.4.1.	<i>Recherche dans les bases de données à l'aide de Mascot.....</i>	28
1.4.4.2.	<i>Regroupement et alignement des peptides à l'aide de MassSense..</i>	31
2.	Matériel et méthodes.....	33
2.1.	Matériel.....	34
2.2.	Méthodes.....	35
2.2.1.	Culture cellulaire.....	35
2.2.2.	Purification des protéines liant l'ubiquitine	35
2.2.3.	Couplage covalent sur billes Affi-gel 15	36
2.2.4.	Préparation des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23	37
2.2.5.	Préparation des échantillons enrichis sur billes de Ni-NTA.....	37
2.2.6.	Préparation des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23 suivie des billes de Ni-NTA.....	38
2.2.7.	Digestion par le domaine catalytique de USP2	38
2.2.8.	Analyse par immunobuvardage.....	39
2.2.9.	Analyse par gel coloré à l'argent.....	40
2.2.10.	Digestion tryptique de bandes.....	40
2.2.11.	Fractionnement sur colonne SCX artisanale	40
2.2.12.	Analyse nanoLC-MS/MS	41
2.2.13.	Recherche des résultats de MS en tandem et corrélation avec une base de données.....	42
2.2.14.	Détection des peptides et création des cartes peptidiques à l'aide du logiciel MassSense.....	42
3.	Méthodes de purification à une étape.....	44
3.1.	Introduction.....	45
3.2.1.	Optimisation du traitement des cellules	47
3.2.2.	Évaluation de 3 protéines possédant un domaine liant l'ubiquitine.	49
3.2.3.	Optimisation de la méthode d'enrichissement avec Rad23	51
3.2.4.	Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon purifié par Rad23.....	56

3.2.5.	Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon de protéines purifié par Rad23.....	67
3.2.6.	Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon purifié sur billes de Ni-NTA	71
3.2.7.	Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon de protéines enrichi sur billes de Ni-NTA	76
3.2.8.	Identification de sites d'ubiquitination sur l'ubiquitine	80
3.3.	Conclusion	83
4.	Méthode de purification à 2 étapes	84
4.1.	Introduction	85
4.2.	Résultats et discussion	86
4.2.1.	Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon enrichi par l'approche à 2 étapes	87
4.2.2.	Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon purifié par l'approche à 2 étapes	93
4.2.3.	Comparaison des approches à 1 et 2 étapes	97
4.3.	Conclusion	98
5.	Validation de l'approche protéomique différentielle.....	99
5.1.	Introduction.....	100
5.2.	Résultats et discussion	102
5.2.1.	Analyse de l'échantillon non traité	104
5.2.2.	Analyse de l'échantillon traité.....	107
5.3.	Conclusion.....	115
6.	Conclusion générale.....	116
7.	Références	119

Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Données relatives au couplage covalent de GST-Rad23 sur billes. a) Valeurs obtenues lors du dosage par BCA des solutions du couplage de GST-Rad23 sur billes Affi-Gel 15. b) Données résultant du couplage.....	56
Tableau 3.2 : Tableau représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.....	62
Tableau 3.3 : Tableau représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.....	74
Tableau 3.4 : Sites d'ubiquitination identifiés par l'approche basée sur la transfection de 6xHis-ubiquitine. Le peptide séquencé, la position de la lysine modifiée ainsi que la différence de masse entre la masse moléculaire observée et théorique du peptide sont présentés.....	78
Tableau 3.5 : Intensité des sites d'ubiquitination identifiés sur l'ubiquitine pour la purification sur colonne d'affinité Rad23 et sur colonne de billes de Ni-NTA.....	81
Tableau 4.1 : Tableau récapitulatif du nombre de groupes de peptides pour chaque échantillon et selon l'élution.....	91
Tableau 4.2 : Sites d'ubiquitination identifiés par l'approche à double purification. Le peptide séquencé, la position de la lysine modifiée ainsi que la différence de masse entre la masse moléculaire observée et théorique du peptide sont présentés.....	95
Tableau 5.1 : Sites d'ubiquitination identifiés dans l'échantillon enrichi par la colonne d'affinité Rad23 et non traité par USP2.....	104

Tableau 5.2 : Tableau récapitulatif représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.....	108
--	------------

Tableau 5.3: Identification des couples de peptides retracés par l'algorithme de recherche.....	113
--	------------

Liste des figures

Figure 1.1 : Structures chimiques. a) Lien isopeptidique entre la glycine terminale de l'ubiquitine et le groupement amine d'une lysine d'une protéine substrat. b) Structure tridimensionnelle de l'ubiquitine illustrant les 7 lysines (rouge), ainsi que les 3 acides aminés de la poche hydrophobe (jaune) [7]. 3

Figure 1.2 : Fonctions associées aux modifications par l'ubiquitine. a) Mono-ubiquitination et multi-ubiquitination. b) Polyubiquitination liée par la K48. c) Polyubiquitination liée par la K11, K29 ou K63. d) Polyubiquitination formée par des chaînes mixtes (inspiré de [10]). 5

Figure 1.3 : Cascade enzymatique du système ubiquitine / protéasome. L'ubiquitine est d'abord activée par sa liaison sur l'enzyme E1. Celle-ci transfère ensuite l'ubiquitine sur une enzyme E2 qui finalement interagit avec une enzyme E3. Si la E3 fait partie de la famille RING, l'ubiquitine est transmise directement sur la protéine cible alors que si l'enzyme E3 fait partie de la famille HECT, l'ubiquitine est d'abord liée sur l'enzyme pour ensuite se lier sur la protéine (inspiré de [15]). 7

Figure 1.4 : Structure tridimensionnelle des domaines UBD en complexe avec l'ubiquitine. a) Structure du domaine UBA. b) Structure du domaine UIM. c) Structure du domaine UIM sous forme double. La molécule de l'ubiquitine est illustrée en jaune avec le centre du cœur hydrophobe, L44, en vert. Les domaines UBD sont illustrés en bleu [19]. 10

Figure 1.5 : Représentation du protéasome 26S. 11

Figure 1.6: Structures chimiques d'inhibiteurs du protéasome. a) MG132 12

Figure 1.7 : Approches de purification des protéines ubiquitinées. a) Méthode utilisant une forme 6xHis-ubiquitine et une purification IMAC. b) Méthode utilisant une

protéine possédant un domaine liant l'ubiquitine. c) Méthode utilisant un anticorps anti-ubiquitine. d) Méthode utilisant un domaine UBD (inspiré de [29]). 13

Figure 1.8 : Détermination des sites d'ubiquitination suite à une digestion trypsique. a) Défaut de coupure de la trypsine suite à la digestion d'une protéine ubiquitinée b) Erreurs d'assignation possibles de l'adduit diglycine causé par la présence d'acides aminés ayant une masse similaire à l'adduit diglycine. Où X représente un acide aminé quelconque et les flèches les sites de coupure trypsique (inspiré de [4]).... 19

Figure 1.9: Composantes principales d'un spectromètre de masse...... 22

Figure 1.10 : Principe de l'ionisation par nébulisation électrostatique...... 23

Figure 1.11 : Vue en coupe de l'analyseur de masse Orbitrap. Électrode centrale (a), électrode externe (b), anneau de céramique isolante (c) [62]. 25

Figure 1.12 : Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Electron) couplé à un système nano de chromatographie liquide (Eksigent) avec un échantillonneur automatique Spark-Holland (Thermo Electron)...... 26

Figure 1.13 : Schéma des composantes du LTQ-Orbitrap [62]. 27

Figure 1.14 : Formation des ions y et b par fragmentation des peptides à basse énergie de collision [66]...... 28

Figure 1.15 : Page de recherche de l'outil Mascot illustrant les différents paramètres de recherche à fixer...... 29

Figure 1.16 : Carte peptidique générée par MassSense à partir des données brutes du MS. L'intensité des peptides est représentée par un gradient de couleurs allant du jaune (forte abondance), au noir (faible abondance). Les charges des peptides sont

représentées par différents symboles : le cercle correspond aux ions simplement chargés, la croix correspond aux doublements chargés, le triangle aux triplements chargés, le carré aux quadruplements chargés et le pentagone aux quintuplements chargés..... 32

Figure 3.1: Schéma de l'approche de purification proposée. 47

Figure 3.2 : Différents traitements et conditions de lyse des cellules EL4. Immunobuvardage anti-ubiquitine illustrant l'efficacité du traitement par comparaison de conditions sans MG132 et de conditions avec des temps d'incubation variables avec MG132 suivi d'une lyse avec ou sans NEM. 48

Figure 3.3 : Purification des protéines de fusion exprimées dans les bactéries *E. coli* BL21. La pureté des protéines produites est démontrée par une coloration à l'argent, GST seule (23,9 kDa), GST-Rad23 (66,3 kDa), GST-Dsk2 (63,4 kDa) et GST-Rpn10 (53,6 kDa). 50

Figure 3.4 : Purification des protéines ubiquitinées à l'aide de 3 colonnes d'affinité différentes. L'efficacité d'enrichissement des protéines GST, Rpn10, Rad23 et Dsk2 est illustrée par un immunobuvardage anti-ubiquitine. 10% du lysat cellulaire initial (In), la fraction non liée (NL) et la fraction liée (Billes) ont été déposés sur gel..... 50

Figure 3.5 : Optimisation du ratio de la quantité de Rad23 pour une quantité fixe de lysat cellulaire. Immunobuvardage anti-ubiquitine de 10% du lysat initial (In), 10% de la fraction non liée (NL) et la totalité de la fraction liée (B) pour chacun des ratios entre les quantités de Rad23 et de lysat..... 52

Figure 3.6 : Optimisation des conditions de lavage de la colonne d'affinité Rad23. Immunobuvardage anti-ubiquitine des protéines ubiquitinées liées par GST-Rad23 suite à des lavages contenant différentes concentrations de NaCl..... 53

Figure 3.7 : Optimisation des conditions d'élution des protéines liées sur la colonne d'affinité Rad23. L'efficacité d'élution des 3 tampons étudiés soit 0,3% SDS, 2 M urée et 0,1 M glycine pH 2,5 est démontrée par un immunobuvardage anti-ubiquitine (a) et une coloration à l'argent (b). 10% du lysat initial (In), les billes de la colonne (B) après l'élution ainsi que 10% de l'éluat (E) sont déposés sur le gel. 54

Figure 3.8 : Réaction chimique du couplage sur billes Affi-Gel 15 entre le groupement *N*-hydroxysuccinimide et les amines libres des protéines [90]...... 55

Figure 3.9 : Purification des protéines ubiquitinées à partir d'un lysat de cellules EL4 sur colonne d'affinité Rad23 ou GST. a) Gel coloré à l'argent de l'échantillon enrichi (95%). b) Immunobuvardage anti-ubiquitine de l'échantillon enrichi (5%). 10% du lysat initial (In) est aussi déposé sur gel. 57

Figure 3.10 : Comparaison du nombre de protéines identifiées selon la méthode de séparation utilisée avant l'analyse au spectromètre de masse. 59

Figure 3.11 : Reproductibilité de la séparation des peptides d'un extrait enrichi en protéines ubiquitinées sur une colonne capillaire SCX. a) Distribution de l'intensité des ions multiplément chargés détectés de façon reproductible à travers des triplicatas. b) Graphique du ratio entre l'intensité du réplicat et l'intensité moyenne pour chaque groupe de peptides. 60

Figure 3.12 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon enrichi par la colonne GST (a) et de celui enrichi par la colonne GST-Rad23 (b). 61

Figure 3.13 : Regroupement similaire de l'intensité des peptides à travers les échantillons. a) Distribution d'intensités des peptides identifiés dans les échantillons purifiés par GST et GST-Rad23. 62

Figure 3.14: Distribution des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes catégories fonctionnelles. 64

Figure 3.15: Spectres MS/MS des peptides portant l'adduit –GG. a) K850 de eIF-3 thêta. b) K195 de la sous-unité alpha type 4 du protéasome...... 67

Figure 3.16 : Structure tridimensionnelle du complexe régulateur 20S du protéasome. a) Vue complète de la structure. b) Plan rapprochée de la K195 (Source : Protein Data Bank, code 1iru). 70

Figure 3.17 : Purification des protéines ubiquitinées à partir d'un lysat de cellules HEK 293 transfectées avec 6xHis-ubiquitine sur colonne de Ni-NTA. a) Immunobuvardage anti-ubiquitine de la purification sur billes de Ni-NTA pour des cellules HEK 293 transfectées par 6xHis-ubiquitine ou le plasmide contrôle. Lysat initial (10%, In), les billes (B) après l'élution et 2% des éluions d'imidazole (40, 75, 150, 300 et 500 mM d'imidazole) sont déposés sur le gel. b) Gel coloré à l'argent de la purification sur billes de Ni-NTA pour des cellules HEK 293 transfectées par 6xHis-ubiquitine ou le plasmide contrôle. Les éluions d'imidazole (10% de 40, 75, 150, 300 et 500 mM d'imidazole) sont déposés sur le gel. 72

Figure 3.18 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon transfecté par le plasmide contrôle (a) et de l'échantillon transfecté par 6xHis-ubiquitine (b)...... 73

Figure 3.19 : Regroupement similaire de l'intensité des peptides à travers les échantillons. a) Distribution d'intensité des groupes de peptides selon leur présence dans l'échantillon de HEK 293 contrôle ou HEK 293 transfecté 6xHis-ubiquitine...... 74

Figure 3.20 : Distribution des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes classes fonctionnelles. 75

Figure 3.21 : Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine. a) HSP70 (fragments y identifiés). b) Rad18 (fragments y⁺⁺ identifiés). c) Isoforme 1 de la Spartine (fragments b⁺⁺). d) Chaîne bêta de la tubuline (fragments y identifiés). 77

Figure 3.22: Structure tridimensionnelle d'une chaîne alpha de la tubuline. a) Vue d'ensemble. b) Plan rapproché des sites d'ubiquitination identifiés (Source : Protein Data Bank, code 1FFX)...... 79

Figure 3.23: Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine sur l'ubiquitine. a) Peptide signature de chaînes liées par la K48 (LIFAGK*QLEDGR). b) Peptide signature de chaînes liées par la K63 (TLSDYNIQK*ESTLHLVLR). c) Peptide signature de chaîne liées par la K11 (TLTGK*TITLEVEPSDTIENVK) de l'ubiquitine. Les séries d'ions y ont été identifiés. 82

Figure 4.1: Purification des protéines par chromatographie d'affinité à 2 étapes.. 87

Figure 4.2 : Purification des protéines ubiquitinées d'un lysat cellulaire de HEK 293 par la stratégie à 2 étapes. Immunobuvardage anti-histidine de l'échantillon purifié sur colonne GST (a) ou Rad23 (b) suivie d'une purification sur billes de Ni-NTA pour l'échantillon non transfecté. Les aliquots suivants ont été déposés sur gel : 0,1% du lysat initial (In), 5% de la fraction non liée des colonnes GST, Rad23 ou Ni (NL), 5% de l'éluat de la colonne GST ou Rad23 (E) et 2% des éluions d'imidazole de la colonne de Ni-NTA (40, 75, 150 et 400 mM). c) Coloration à l'argent de 10% des éluions du gradient d'imidazole (40, 75, 150 et 400 mM) de la colonne de Ni-NTA pour les échantillons transfectés ou non..... 88

Figure 4.3 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon transfecté par le plasmide contrôle (a) et par 6xHis-ubiquitine (b). 90

Figure 4.4 : Regroupement similaire des peptides à travers les échantillons. Distribution d'intensités des groupes de peptides selon leur appartenance aux échantillons transfectés 6xHis-ubiquitine ou non. a) Éluion 150 mM imidazole b) Éluion 400 mM imidazole..... 91

Figure 4.5 : Classement des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes catégories fonctionnelles. 93

Figure 4.6 : Structure tridimensionnelle de la sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S (source : Protein Data Bank, code 2ZKR)..... 94

Figure 4.7: Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine a) Sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S (série d'ions y⁺⁺). b) Isoforme 5 de l'antigène mineur H13 histocompatible (série d'ions y). c) Protéine 1B de type choc thermique 70 kDa (série d'ions b)..... 96

Figure 4.8 : Diagramme de Venn des identifications communes entre les différentes stratégies d'enrichissement...... 97

Figure 5.1: Schéma de l'approche protéomique différentielle proposée pour l'identification des sites d'ubiquitination...... 102

Figure 5.2: Déubiquitination des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23. a) Immunobuvardage anti-ubiquitine illustrant l'efficacité de digestion du domaine catalytique de l'enzyme de déubiquitination (USP2) des protéines ubiquitinées.

Représente 2% des échantillons traités ou non. **b)** Gel coloré à l'argent des échantillons traités ou non (10%) avec USP2. 103

Figure 5.3: Structure tridimensionnelle de la kinase cycline-dépendante 1 (Source : Protein Data Bank, code 1LC9). 105

Figure 5.4 : Spectre MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine. **a)** Cytochrome P450 CYP2J9 (série d'ions y) **b)** Désaturase 2 acétyl-coA (séries d'ions b). **c)** CDK1 (série d'ions y). **d)** Protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L (série d'ions b)..... 106

Figure 5.5 : Regroupement similaire des peptides à travers les échantillons. **a)** Distribution d'intensité des groupes de peptides selon leur identification dans les échantillons digérés ou non avec le domaine catalytique de USP2.....107

Figure 5.6 : Schéma illustrant le cas d'une protéine multi-ubiquitinée existant sous 2 états différents d'ubiquitination dans la cellule......109

Figure 5.7 : Schéma des étapes suivies par l'algorithme de recherche......111

Figure 5.8 : Diagrammes circulaires illustrant les statistiques d'identifications des peptides recherchés. **a)** Diagramme circulaire classant tous les peptides recherchés dans 3 catégories dépendamment de la présence d'une arginine au site potentiel d'ubiquitination, que le peptide possède moins de 6 acides aminés ou plus de 30 et que les peptides proviennent d'un site potentiel d'ubiquitination. **b)** Diagramme circulaire des peptides potentiels divisés selon 4 catégories : les peptides recherchés sont présents dans les 2 échantillons ou uniques à l'un ou l'autre des échantillons et tous les autres peptides potentiels n'ayant pas été identifiés.....112

Figure 5.9 : Structure tridimensionnelle de la protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L (Source : Protein Data Bank, code 1BZ9).....114

Liste des abréviations

2D-LC	Chromatographie liquide à 2 dimensions (2 dimensional liquid chromatography)
ACN	Acétonitrile (acetonitrile)
ADN	Acide désoxyribonucléique (deoxyribonucleic acid)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire (complementary deoxyribonucleic acid)
AgNO ₃	Nitrate d'argent (silver nitrate)
ARN	Acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ATP	Adénosine triphosphate (adenosine triphosphate)
BCA	Acide bicinchoninique (bicinchoninic acid)
BSA	Albumine sérique de bovin (bovine serum albumin)
C ₁₈	Phase stationnaire d'octadécylsilane (octadecylsilane stationary phase)
CDK1	Kinase cycline-dépendante 1 (cyclin-dependant kinase 1)
CID	Dissociation induite par collision (collision induced dissociation)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité (major histocompatibility complex)
DMEM	Milieu de culture Eagle, modifié selon Dubelco (Dubelco's modified Eagle's medium)
DMEM+	Milieu de culture Eagle, modifié selon Dubelco, haute teneur en glucose (Dubelco's modified Eagle's medium, high glucose)
DTT	Dithiothréitol (dithiothreitol)
DUB	Enzyme de déubiquitination (deubiquitinating enzyme)
E1	Enzyme d'activation de l'ubiquitine (ubiquitin-activating enzyme)
E2	Enzyme de conjugaison d'ubiquitine (ubiquitin-conjugating enzyme)
E3	Ligase ubiquitine-protéine (ubiquitin-protein ligase)
ECL	Chimioluminescence enzymatique (enzymatic chemiluminescence)
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGFR	Récepteur épidermal du facteur de croissance (epidermal growth factor receptor)

EIF-3 θ	Sous-unité 10 du facteur eukaryotique 3 d'initiation de la traduction (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10)
ESI	Ionisation par nébulisation électrostatique (electrospray ionization)
FA	Acide formique (formic acid)
FBS	Sérum de foetus bovin (fetal bovine serum)
-GG	Adduit diglycine (diglycin adduct)
GST	S-transférase glutathion (glutathione S-transferase)
HEK 293	Cellules rénales d'embryons humains 293 (Human Embryonic Kidney cells 293)
HEPES	Acide 4-2(hydroxyethyl)pipérazine-1-éthanesulfonique (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (high performance liquid chromatography)
IMAC	Chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (immobilized-metal affinity chromatography)
IPI	Index de protéines international (international protein index)
IPTG	Isopropylthio- β -galactoside (isopropylthio- β -galactoside)
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricyanure de potassium (potassium ferricyanide)
LB	Bouillon Luria (Luria Broth)
LC	Chromatographie liquide (liquid chromatography)
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (liquid chromatography coupled to mass spectrometry)
MALDI	Ionisation par désorption laser avec matrice (matrix-assisted laser desorption ionization)
MCM	Maintenance des minichromosomes (minichromosome maintenance)
MG132	Carbobenzoxo-leuciny-l-leuciny-l-leucinal (Carbobenzoxo-leuciny-l-leuciny-l-leucinal)
MS	Spectrométrie de masse (mass spectrometry)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (tandem mass spectrometry)
m/z	Rapport masse sur charge (mass to charge ratio)
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium (sodium carbonate)

Na ₂ SO ₃	Thiosulfate de sodium (sodium thiosulfate)
NaCl	Chlorure de sodium (sodium chloride)
NaF	Fluorure de sodium (sodium fluoride)
NCBI	Centre national de l'information biotechnologique (National Center for Biotechnology Information)
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide (<i>N</i> -ethylmaleimide)
NH ₄ CO ₃	Bicarbonate d'ammonium (ammonium bicarbonate)
NH ₄ HCO ₂	Formate d'ammonium (ammonium formate)
Ni-NTA	Nickel-acide nitriloacétique (nickel-nitrilotriacetic acid)
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline)
PCNA	Antigène nucléaire de prolifération cellulaire (proliferating cell nuclear antigen)
Pi	Groupe phosphate inorganique (inorganic phosphate)
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyl (Phenylmethanesulfonyl fluoride)
PTM	Modification post-traductionnelle (post-translational modification)
SCX	Chromatographie échangeuse de cations à forte interaction (strong cation exchange chromatography)
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sulfate dodécyl sodium (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis)
SPITC	4-Sulfophényl-isothiocyanate (4-sulfophenyl-isothiocyanate)
TCEP	Phosphine tris[2-carboxyéthyle] (Tris[2-carboxyethyl] phosphine)
TBS	Tampon Tris-salin (Tris buffered saline)
TBST	Tampon Tris-salin avec détergent Tween (Tris buffered saline-Tween)
TOF	Analyseur de masse à temps d'envol (time-of-flight mass spectrometer)
Tr	Temps de rétention (retention time)
Tris	Tris(hydroxyméthyl) aminométhane (tris(hydroxyméthyl) aminométhane)
UBA	Domaine associé à l'ubiquitine (ubiquitin-associated domain)
UBD	Domaine liant l'ubiquitine (ubiquitin-binding domain)
UBL	Protéine similaire à l'ubiquitine (ubiquitin-like protein)
UBP	(Ubiquitin binding protease)
UIM	Motif interagissant avec l'ubiquitine (ubiquitin interacting motif)

Remerciements

D'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche le Dr Pierre Thibault pour son accueil au sein de son groupe. L'encouragement et la confiance qu'il m'a accordés, ses conseils constructifs et l'intérêt qu'il a manifesté à la progression de mon projet m'ont permis de mener à terme ce dernier. J'aimerais aussi remercier mon codirecteur de recherche, le Dr Sylvain Meloche, pour ses conseils concernant l'aspect biologique de mon projet.

Je souhaite également remercier Pierre-Luc Tanguay pour ses multiples conseils et suggestions tout au long du projet. Son esprit critique et sa grande expérience en laboratoire ont permis de rapides progrès dès le début du projet.

De plus, je désire remercier le Dr Eric Bonneil pour le partage de ses connaissances sur la spectrométrie de masse, Kevin Eng et Mathieu Courcelles pour leur assistance aux outils bioinformatiques ainsi que Christelle Pomiès pour son aide dans les différentes techniques de biologie moléculaire. J'aimerais aussi souligner la contribution de Catherine Julien pour m'avoir introduite aux secrets de la culture cellulaire et de la production de protéines de fusion en bactéries. De plus, je remercie sincèrement Gaëlle Bridon pour d'enrichissantes discussions et pour son aide lors de l'écriture de ce mémoire. Mes remerciements s'adressent également à mes collègues de laboratoire des groupes Thibault et Meloche pour avoir créé un environnement d'entraide et stimulant les échanges de connaissances.

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille et mes amis pour leur encouragement, leur soutien et leur compréhension. Il est difficile de prévoir l'issue d'un projet scientifique et la confiance qu'ils m'ont témoignée m'a aidé à persévérer.

Pour terminer, je remercie le CRSNG ainsi que la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur soutien financier qui m'ont permis de me consacrer à cette aventure sans soucis monétaire.

1. Introduction générale

1.1. But du projet

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle régulant un large éventail d'événements à l'échelle cellulaire, notamment la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN ainsi que la régulation de la transcription [1]. Un dérèglement de ce système est impliqué dans de nombreuses maladies notamment le cancer, les désordres inflammatoires et les dysfonctionnements métaboliques [1]. Récemment, ce système a émergé comme cible thérapeutique et plusieurs petites molécules chimiques inhibant la cascade enzymatique d'ubiquitination ou l'activité du protéasome ont été découvertes [2]. Par exemple, en 2003, un inhibiteur du protéasome a été admis sur le marché des médicaments pour le traitement du cancer [3]. Ainsi, des méthodologies permettant une analyse globale des protéines ubiquitinées vont conduire à une meilleure caractérisation des systèmes régulés par l'ubiquitination.

Dans ce contexte, ce projet vise à mettre au point une approche protéomique différentielle originale pour améliorer l'identification des protéines ubiquitinées et de leurs sites d'ubiquitination. La première partie du projet consiste à mettre au point une approche de purification des protéines ubiquitinées en comparant différentes stratégies. Cette étape d'enrichissement s'avère essentielle puisque les protéines ubiquitinées sont en faible abondance dans la cellule [4].

La seconde partie du projet consiste à développer une nouvelle approche différentielle protéomique exploitant l'utilisation d'une enzyme de déubiquitination afin de faciliter l'identification de sites d'ubiquitination à l'échelle du protéome. L'échantillon des protéines ubiquitinées purifiées par l'approche développée sera séparé en 2 parties dont une seule sera traitée avec l'enzyme de déubiquitination. Les 2 échantillons seront ensuite digérés par la trypsine et analysés par nanoLC-MS/MS sur un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap à haute résolution. Suite à la digestion trypsique, les ions peptidiques conjugués à l'ubiquitine conservent un adduit diglycine signature du site d'ubiquitination. Une analyse poussée des données à l'aide d'un logiciel de détection de peptides révélera deux populations distinctes d'ions représentant les peptides contenant ou non l'adduit diglycine.

1.2. Processus d'ubiquitination dans la cellule

1.2.1. Rôles biologiques

La cellule utilise constamment des systèmes de modifications post-traductionnelles des protéines pour générer et transmettre des signaux. Une de ces modifications est l'ubiquitination. Tout d'abord, l'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés dont la séquence est hautement conservée entre les espèces [5]. Elle joue un rôle crucial dans la cellule notamment en modulant la dégradation sélective de protéines régulatrices importantes par le protéasome [6]. En fait, ce système est impliqué au niveau de la progression du cycle cellulaire, de la signalisation cellulaire, de la régulation de récepteurs, de la réparation de l'ADN, de l'endocytose, etc. [1]. D'abord, l'ubiquitination est une réaction enzymatique qui résulte en la formation d'un lien isopeptidique entre la glycine 76 (G76) de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et le groupement amine de la chaîne latérale d'une lysine de la protéine cible (figure 1.1 a).

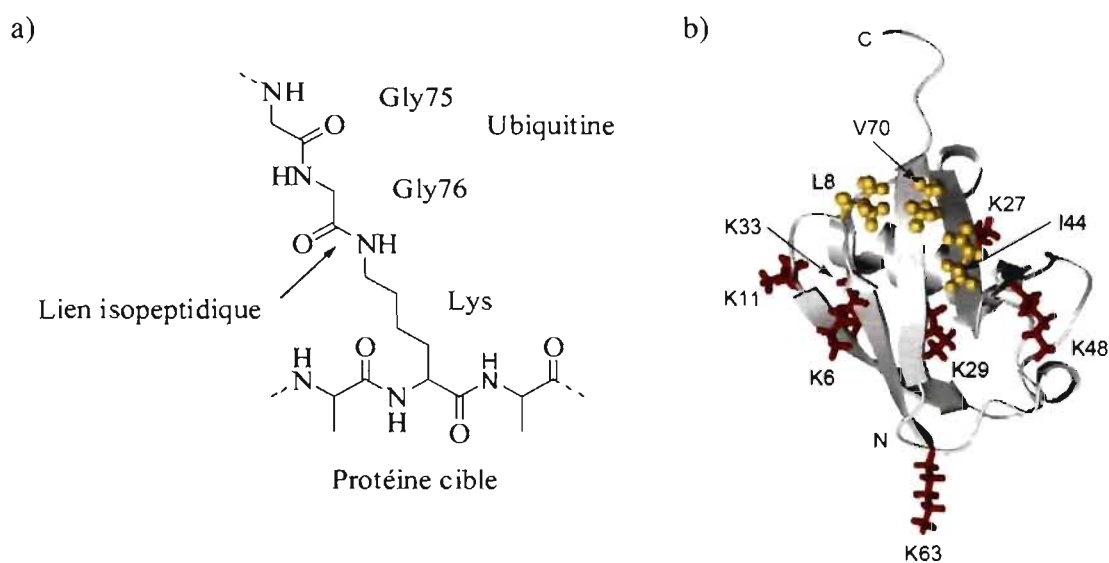


Figure 1.1 : Structures chimiques. a) Lien isopeptidique entre la glycine terminale de l'ubiquitine et le groupement amine d'une lysine d'une protéine substrat. b) Structure tridimensionnelle de l'ubiquitine illustrant les 7 lysines (rouge), ainsi que les 3 acides aminés de la poche hydrophobe (jaune) [7].

L'ubiquitine modifie de différentes façons les protéines. En effet, les substrats peuvent être mono-ubiquitinés via la liaison d'une seule molécule, être polyubiquitinés via la liaison d'une chaîne d'ubiquitines ou multi-ubiquitinés via la liaison de plusieurs ubiquitine sur plusieurs lysines de la protéine (figure 1.2) [8]. Puisque l'ubiquitine contient elle-même sept lysines (figure 1.1 b), il est possible de former des chaînes de structures variables. De plus, l'utilisation de ces sept sites pour créer des chaînes *in vivo* a été démontrée chez la levure [9]. Le signal généré varie selon le type de modification par l'ubiquitine. Par exemple, la mono-ubiquitination est impliquée dans le processus d'endocytose, de réparation de l'ADN ou d'export nucléaire [10]. Le signal le plus connu est celui des chaînes d'ubiquitines liées par la lysine 48 (K48). Ce type de chaîne formée de 4 unités ou plus d'ubiquitines est le signal principal pour la dégradation protéasomale [11]. Les chaînes liées par les lysines 11, 29 ou 63 sont des signaux de réparation de l'ADN, d'endocytose et de signalisation [10]. Des évidences de chaînes mixtes, c'est-à-dire avec des embranchements liés par des lysines voisines ont été détectées *in vivo* et pourraient avoir un rôle dans la régulation des enzymes E3 ligases [12]. Un schéma résumant les différentes fonctions associées aux modifications par l'ubiquitine est présenté à la figure 1.2. Cette variété de structures permet à la cellule de disposer d'un grand répertoire de signal ubiquitine.

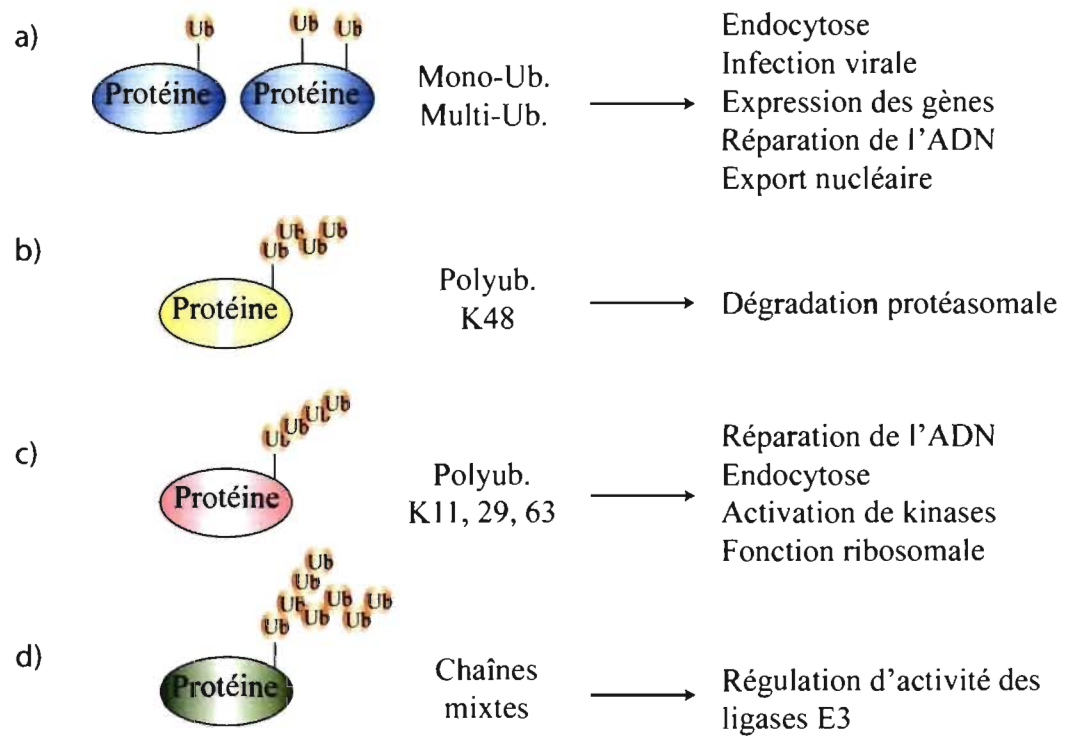


Figure 1.2 : Fonctions associées aux modifications par l'ubiquitine.

a) Mono-ubiquitination et multi-ubiquitination. b) Polyubiquitination liée par la K48. c) Polyubiquitination liée par la K11, K29 ou K63. d) Polyubiquitination formée par des chaînes mixtes (inspiré de [10]).

En plus de l'ubiquitine, il existe une classe de protéines appelées protéines similaires à l'ubiquitine (UBL). Cette classe peut être divisée en 2 groupes, d'abord il y a les protéines qui peuvent être conjuguées à d'autres protéines pour les modifier après leur traduction, par exemple les protéines SUMO et Nedd8. Ces petites protéines ont parfois peu de ressemblance avec l'ubiquitine mais elles partagent toutes un mode de conjugaison et un site de liaison qui ressemblent à l'ubiquitine [1]. Ensuite, les protéines qui possèdent un domaine UBL dans leur structure font aussi partie de cette classe. Par exemple, les protéines Rad23 et Dsk2, dont les rôles seront expliqués plus en détails dans une section suivante, possèdent un tel domaine.

1.2.2. Enzymes impliquées

1.2.2.1. Enzymes d'ubiquitination

L'ubiquitination est un mécanisme dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) et impliquant 3 enzymes : enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1), enzyme de conjugaison d'ubiquitine (E2) et une ligase ubiquitine-protéine (E3) [1]. Tout d'abord, il existe une seule forme d'enzyme E1 chez la majorité des organismes dont l'humain et la levure. Cette enzyme se lie à l'ubiquitine via un lien thio-ester en présence d'ATP. Par cette réaction, l'ubiquitine est activée et peut être transférée à une enzyme E2. Il existe différentes familles de E2, toutes partageant le même domaine d'environ 150 acides aminés. Typiquement, chaque E2 interagit avec plusieurs ligases E3, ce sont ces dernières qui forment finalement le lien covalent entre le substrat protéique et l'ubiquitine [6]. Ces ligases sont responsables de la reconnaissance spécifique des substrats du système de l'ubiquitine et il en existe plus de 1000 chez l'humain [13]. C'est aussi à ce niveau que se situe la plus grande variété de structures. Ces enzymes peuvent être classées en 2 grandes familles : les E3 possédant un domaine HECT et les E3 possédant un domaine RING [1]. Les enzymes de la famille HECT possèdent un domaine homologue de 350 acides aminés contenant un résidu cystéine. L'ubiquitine est d'abord transférée de l'enzyme E2 sur cette cystéine et ensuite sur le substrat. Quant à elles, les enzymes de la famille RING ont un patron conservé de résidus histidines et cystéines formant une structure au centre de laquelle se lient possiblement deux cations zinc. Cette famille est en mesure de transférer directement l'ubiquitine, sans s'y lier, à des substrats divers ainsi qu'à d'autres protéines RING [14]. Les différentes étapes de la réaction enzymatique d'ubiquitination sont illustrées à la figure 1.3.

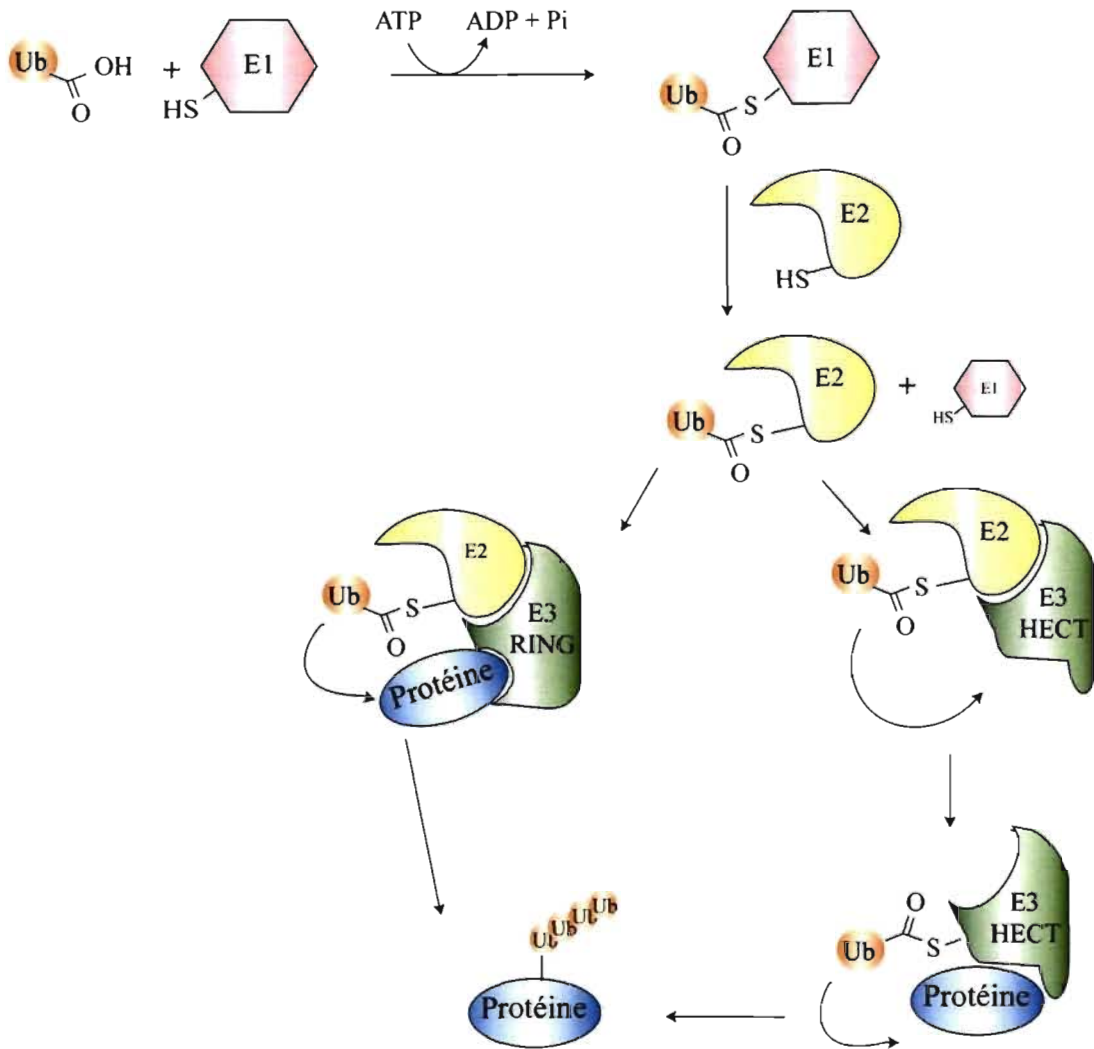


Figure 1.3 : Cascade enzymatique du système ubiquitine / protéasome.

L'ubiquitine est d'abord activée par sa liaison sur l'enzyme E1. Celle-ci transfère ensuite l'ubiquitine sur une enzyme E2 qui finalement interagit avec une enzyme E3. Si la E3 fait partie de la famille RING, l'ubiquitine est transmise directement sur la protéine cible alors que si l'enzyme E3 fait partie de la famille HECT, l'ubiquitine est d'abord liée sur l'enzyme pour ensuite se lier sur la protéine (inspiré de [15]).

Il existe différents modes de reconnaissance et de régulation des substrats protéiques par les enzymes E3, par contre, pour la majorité des cas, le mécanisme précis est inconnu [1]. De façon générale, le système ubiquitine / protéasome peut être régulé

au niveau de l'ubiquitination ou au niveau de l'activité du protéasome. Il existe aussi des régulations plus spécifiques au niveau du substrat. Par exemple, certaines protéines doivent être phosphorylées avant d'être reconnues comme cible pour l'ubiquitination. De plus, une protéine peut être reconnue par une séquence spécifique telle la boîte de destruction chez les cyclines mitotiques [1]. Une protéine mal repliée, mutée ou anormale va aussi être efficacement ubiquitinée et dégradée par le protéasome.

1.2.2.2. Enzymes de déubiquitination

L'ubiquitination, tout comme la phosphorylation, est une modification réversible. En effet, de nombreuses enzymes de déubiquitination (DUB) sont actives dans la cellule. Ces protéases hydrolysent spécifiquement le lien amide immédiatement après l'extrémité $-COOH$ du résidu glycine de l'ubiquitine. La majorité des DUB sont des protéases à cystéines, c'est-à-dire que l'activité enzymatique dépend d'une cystéine présente au site catalytique. La déprotonation de la cystéine est assistée par une histidine adjacente, elle-même polarisée par un résidu acide aspartique. Lors du clivage, le résidu cystéine réalise une attaque nucléophile sur le groupement carbonyle du lien peptidique entre l'ubiquitine et le substrat. L'intermédiaire, contenant un oxanion, est stabilisé dans le puits oxanion, constitué d'un résidu glutamine, acide glutamique ou asparagine. Le résultat de cette attaque est la libération du substrat et la formation d'un intermédiaire entre la DUB et l'ubiquitine. Cet intermédiaire réagit ensuite avec une molécule d'eau pour relâcher l'ubiquitine [16]. Il y a 5 grandes familles de DUB : les hydrolases ubiquitine C-terminal (UCH), les protéases ubiquitine-spécifique (USP ou UBP), les protéases du domaine protéique de la maladie Machado-Joseph (MJD), les protéases tumeur ovarien (OTU) et les protéases du motif JAMM. Chacun des membres de ces familles partagent une homologie de séquence.

Ces enzymes ont 4 fonctions majeures soit le clivage des polymères d'ubiquitines synthétisés par les ribosomes, l'édition, le recyclage et la rupture des chaînes d'ubiquitines libres [17]. D'abord, l'ubiquitine est encodée dans le génome sous forme de polyubiquitine ou d'une fusion avec les sous-unités S27 ou L40 du ribosome. Ainsi,

les DUB doivent libérer le monomère d'ubiquitine pour qu'il soit utilisé. La deuxième fonction, soit l'édition, consiste à renverser l'effet de l'ubiquitination avant l'action du signal. Le recyclage, quant à lui, fait référence à l'activité isopeptidase qui régénère des ubiquitines libres une fois l'action d'ubiquitination complétée. Finalement, la dernière fonction consiste à défaire les chaînes d'ubiquitines par des activités d'amidase ou d'estérase. Ce type de chaînes pourrait provenir d'attaques nucléophiles par de petites molécules intracellulaires, tel le glutathion, sur les intermédiaires thiol-ester formés entre l'ubiquitine et les E1, E2 et E3 [17]. Ainsi, chacune des étapes illustrées à la figure 1.3 est réversible grâce aux DUB. La spécificité de ces enzymes repose sur la reconnaissance de la protéine ubiquitinée et l'ubiquitine mais aussi sur d'autres facteurs tels la localisation cellulaire et l'interaction avec des partenaires de liaison [16].

1.2.3. Description du système ubiquitine / protéasome

Le système ubiquitine / protéasome est constitué principalement de 2 étapes. La première consiste à activer l'ubiquitine et à la lier sur une protéine cible tel que décrit dans la section précédente. La seconde étape consiste à livrer cette protéine ubiquitinée au protéasome 26S pour qu'elle y soit dégradée en peptides [1]. La reconnaissance d'un substrat ubiquitiné dépend de protéines liant l'ubiquitine aussi appelées récepteurs d'ubiquitine [13]. Ces protéines possèdent un petit domaine liant l'ubiquitine (UBD) qui interagit directement avec la mono-ubiquitine et/ou les chaînes de polyubiquitine. Tous les domaines UBD se lient sur le cœur hydrophobe de l'ubiquitine dont font partie la leucine 8 (L8), l'isoleucine 44 (I44) et la valine 70 (V70) [18]. Ces 3 résidus sont illustrés en jaune sur la structure de l'ubiquitine de la figure 1.1 b). De nombreux domaines ont été caractérisés et classés dans ce groupe dont le domaine associé à l'ubiquitine (UBA) et le motif interagissant avec l'ubiquitine (UIM). D'abord, le domaine UBA est formé de 3 hélices alpha compactes alors que le domaine UIM est formé d'une seule hélice alpha centrée autour d'un résidu alanine (figure 1.4 a) [19]. Ce dernier existe sous forme simple ou double (figure 1.4 b, c).

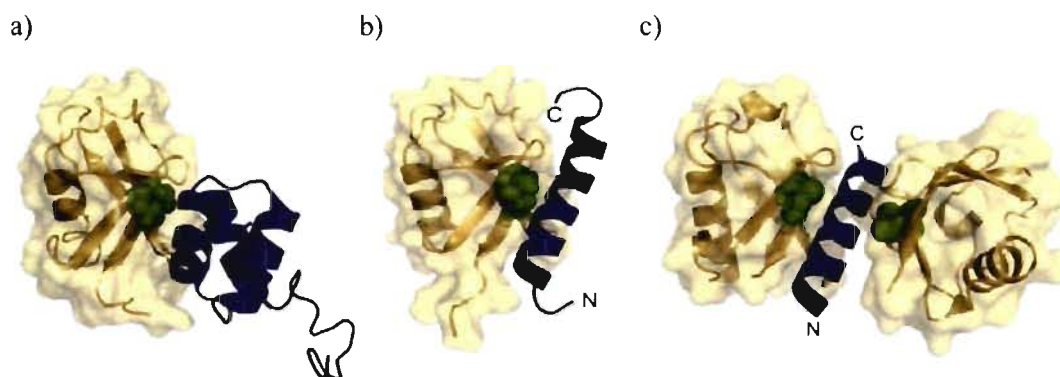


Figure 1.4 : Structure tridimensionnelle des domaines UBD en complexe avec l'ubiquitine. a) Structure du domaine UBA. b) Structure du domaine UIM. c) Structure du domaine UIM sous forme double. La molécule de l'ubiquitine est illustrée en jaune avec le centre du cœur hydrophobe, L44, en vert. Les domaines UBD sont illustrés en bleu [19].

Ainsi, il a été démontré que les protéines Rad23 et Dsk2 possèdent des domaines UBA et interagissent avec le protéasome via un domaine UBL situé à leur extrémité N-terminale [20]. Leur rôle serait donc de conduire les protéines ubiquitinées au protéasome. Rad23 possède 2 domaines UBA, UBA1 est situé au centre de la protéine alors que UBA2 est situé à l'extrémité C-terminale [21]. Cette protéine interagit de façon sélective avec les chaînes d'ubiquitine liées par la K48 et a plus d'affinité pour une chaîne formée de 4 à 6 unités [21, 22]. Pour sa part, Dsk2 lie les chaînes polyubiquitinées sans spécificité pour un type de liaison, par exemple liées par la K48 ou la K63 [21]. Le domaine UBL adopte une structure tertiaire mimant l'ubiquitine ce qui lui permet d'interagir avec une sous-unité spécifique du protéasome.

L'étape finale de ce système est donc la dégradation de la protéine ubiquitinée en acides aminés et en peptides par le protéasome 26S [1]. Les peptides peuvent être utilisés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le protéasome est un complexe protéique ayant une structure modulaire fortement conservée à travers les espèces et très homogène parmi les eucaryotes [23]. Le protéasome est composé de 2 sous-complexes majeurs : le complexe catalytique 20S et le complexe régulateur 19S. D'abord, le cœur catalytique 20S a une structure en baril formée de 4 anneaux dont les 2

anneaux du centre, les sous-unités bêta contiennent les sites actifs de protéolyse (figure 1.5) [1]. Les 2 anneaux situés aux extrémités sont formés des sous-unités alpha et constituent la barrière à franchir pour les substrats destinés à être dégradés.

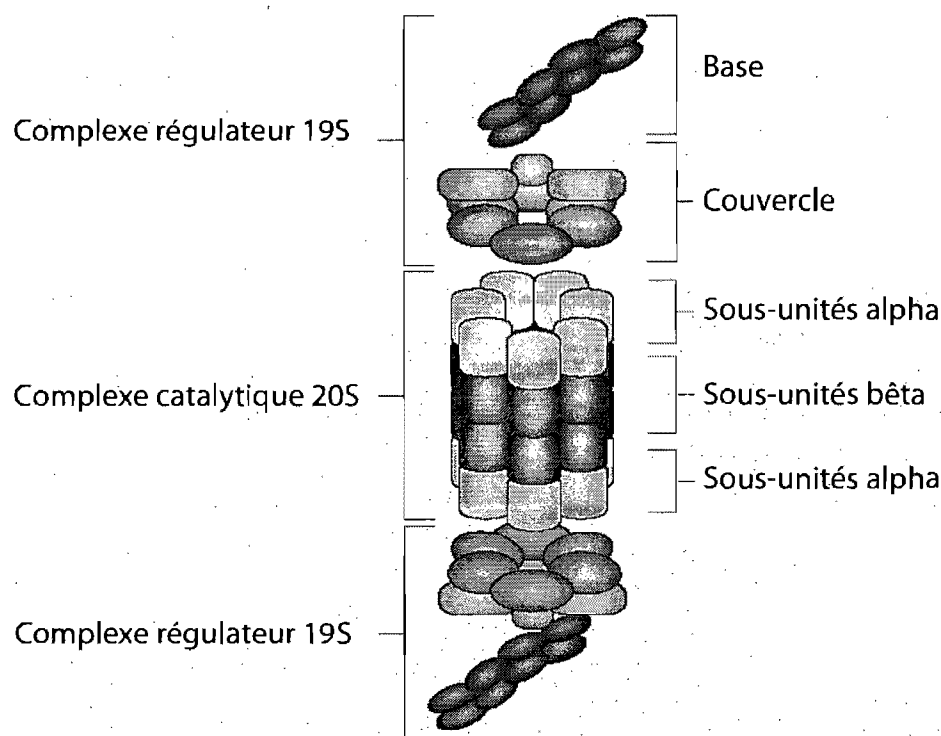
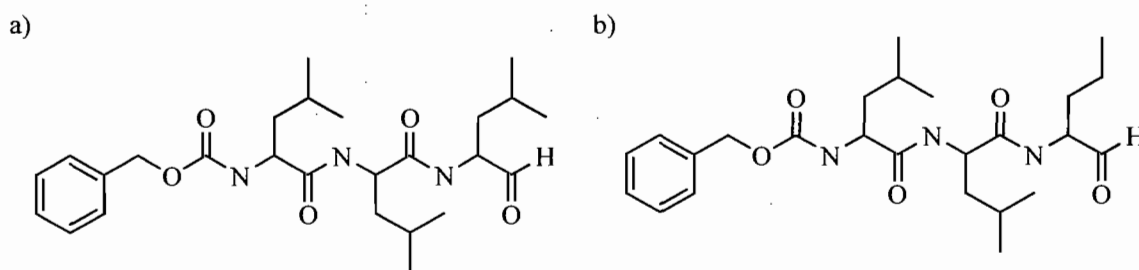


Figure 1.5 : Représentation du protéasome 26S.

Pour sa part, le complexe régulateur 19S est situé à l'une ou l'autre extrémité du complexe 20S et peut lui-même être divisé en 2 parties : la base et le couvercle [23]. La base est formée de 6 sous-unités ATPases (Rpt1-6) et de 3 sous-unités non-ATPases (Rpn1, Rpn2 et Rpn10). Le couvercle est composé de 8 sous-unités non-ATPases (Rpn3, -5, -6, -7, -8, -9, -11, -12). Les sous-unités ATPases ont pour fonction de déplier les substrats et de les transmettre au complexe 20S. Un des rôles importants du complexe régulateur est de reconnaître les protéines ubiquitinées et d'autres substrats potentiels du protéasome [1]. Ainsi, la sous-unité Rpn10 est en mesure de lier les chaînes polyubiquitine d'une protéine ubiquitinée [24]. C'est aussi au niveau de cette sous-unité que Rad23 et Dsk2 interagissent avec le protéasome via leur domaine UBL [25].

Afin d'étudier plus en détails le protéasome, des inhibiteurs ont été mis au point. Ces composés chimiques de faibles masses moléculaires entrent efficacement dans la cellule et inhibent sélectivement le protéasome [26]. Les plus couramment utilisés sont des peptides aldéhyques, par exemple le carbobenzoxy-leucinyl-leucinyl-leucinal (MG132) ou le carboxybenzoxy-leucinyl-leucinyl-norvalinal (MG115), qui constituent des analogues de substrats ou des inhibiteurs de l'état de transition de la réaction enzymatique du protéasome (figure 1.6) [26]. Lorsque ces inhibiteurs sont utilisés, les protéines ubiquitinées, cibles du protéasome, vont s'accumuler de façon significative. Ainsi, des protéines ayant des défauts de structures, de courtes ou longues demi-vies ainsi que des protéines associées au réticulum endoplasmique ne seront pas dégradées [26].



**Figure 1.6: Structures chimiques d'inhibiteurs du protéasome. a) MG132
b) MG115**

1.3. Étude des protéines ubiquitinées par spectrométrie de masse

1.3.1. Méthodes de purification des protéines ubiquitinées

L'étude des protéines ubiquitinées est un domaine en plein essor depuis quelques années et de nombreuses stratégies protéomiques ont été mises au point dans l'espoir de mieux caractériser ce système d'une grande complexité. Toutefois, l'abondance des protéines ubiquitinées est généralement trop faible pour que ces dernières soient détectées sans enrichissement. Ceci est causé par leur dégradation rapide par le protéasome et la présence des DUB. Ainsi, la majorité des études font appel à des

inhibiteurs du protéasome et à des inhibiteurs d'isopeptidases tels le *N*-éthylmaleimide (NEM) ou l'iodoacétamide [27], [28]. Une fois les protéines ubiquitinées en plus grande concentration dans la cellule, il est possible de procéder à leur purification. Pour ce faire, il existe différentes méthodes de purification que l'on peut classer en 4 catégories : méthodes utilisant une forme modifiée de l'ubiquitine, un anticorps anti-ubiquitine, une protéine liant l'ubiquitine ou utilisant un domaine liant l'ubiquitine (figure 1.7) [29].

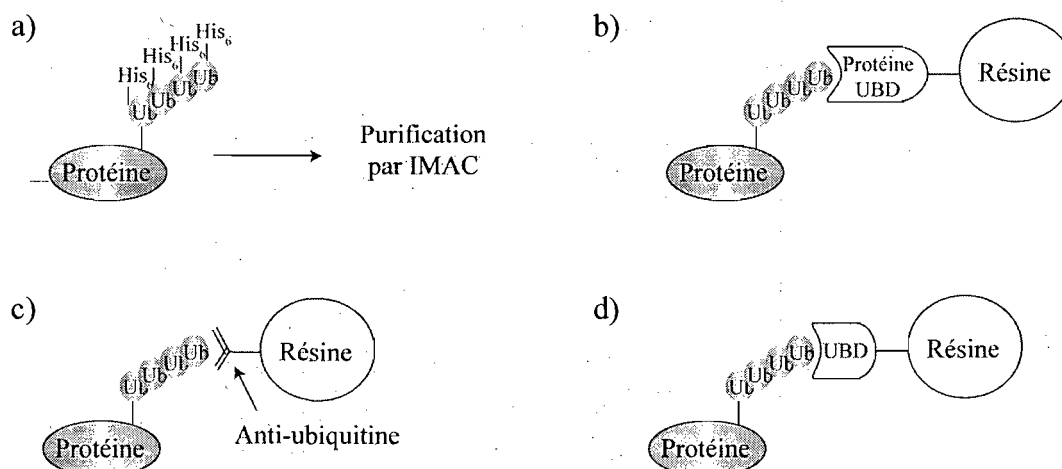


Figure 1.7 : Approches de purification des protéines ubiquitinées.

- a)** Méthode utilisant une forme 6xHis-ubiquitine et une purification IMAC.
- b)** Méthode utilisant une protéine possédant un domaine liant l'ubiquitine.
- c)** Méthode utilisant un anticorps anti-ubiquitine.
- d)** Méthode utilisant un domaine UBD (inspiré de [29]).

1.3.1.1. Utilisation d'une forme modifiée de l'ubiquitine

La première catégorie de méthodes d'enrichissement fait appel à une forme modifiée par un épitope de l'ubiquitine. Un épitope est en fait une séquence d'acides aminés de longueur variable reconnu par un anticorps. Les épitopes hexa- ou octa-histidine (6xHis, 8xHis), hémagglutinine du virus de l'influenza (HA) et myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) ont été utilisés pour l'étude des protéines ubiquitinées [29]. Il y a d'abord une étape de modification génétique du modèle étudié suivi d'une immunoprécipitation avec l'anticorps correspondant. Lorsque l'épitope

utilisé est 6xHis ou 8xHis, la purification se fait par chromatographie d'affinité sur métal immobilisé (IMAC) à l'aide de billes sur lesquelles sont immobilisés des groupements nickel-acide nitriloacétique (Ni-NTA) [30]. Chez la levure, une souche mutante est créée par délétion de tous les gènes codant pour l'ubiquitine et en introduisant un plasmide d'ADN codant pour la forme modifiée de l'ubiquitine [9]. Ainsi, la seule forme d'ubiquitine exprimée est celle modifiée par l'épitope choisi. Chez des cellules eucaryotes, il faut recourir à la transfection stable ou transitoire. La transfection est un processus de transfert de gènes, c'est-à-dire qu'il y a introduction d'ADN exogène dans les cellules. L'ADN est habituellement sous forme de plasmide d'ADN superenroulé et entre dans la cellule suite à l'ouverture transitoire de pores dans la membrane cellulaire. Lors d'une transfection transitoire, l'ADN introduit sera perdu lors de la division cellulaire [31].

Afin d'augmenter la spécificité de l'approche, il est possible d'utiliser 2 épitopes selon 2 stratégies différentes. La plus simple consiste à exprimer une forme contenant 2 épitopes sur l'ubiquitine, par exemple 6xHis-biotine-ubiquitine [32]. Dans ce cas, la purification se fait à l'aide de 2 colonnes successives. La deuxième stratégie est appelée purification par affinité en parallèle et est basée sur la co-expression de 2 formes modifiées d'ubiquitine soit une forme 8xHis-ubiquitine et une forme Flag-ubiquitine [33]. Ce dernier étant un petit peptide de 8 acides aminés : DYKDDDDK [34]. De cette façon, les chaînes d'ubiquitines vont être composées des 2 épitopes. Ceci permet d'éliminer les protéines mono-ubiquitinées et les protéines contaminantes puisque 2 colonnes de purification sont utilisées dont la première est sous conditions dénaturantes afin de défaire les complexes.

Une dérivation chimique peut aussi être couplée avec une transfection telle que proposée par Jeon *et al.* [35]. Les cellules étudiées sont d'abord transfectées avec une forme 8xHis de l'ubiquitine suivie d'une étape de clivage chimique avec le bromure de cyanogène qui produit des polypeptides tout en laissant intacte l'ubiquitine. Ce réactif clive le lien peptidique à l'extrémité C-terminale des méthionines. Puisque l'ubiquitine possède une seule méthionine en position 1 de sa séquence, la presque totalité de sa

structure est conservée. Ensuite, il est possible d'utiliser une colonne de nickel pour purifier les protéines ubiquitinées. Cette stratégie permettrait de réduire la présence de protéines fortement abondantes.

La possibilité d'affecter l'équilibre naturel de l'ubiquitination en surexprimant la forme modifiée d'ubiquitine est le désavantage de cette approche [36]. En effet, l'impact sur les enzymes d'ubiquitination à savoir leur efficacité à utiliser la forme modifiée de l'ubiquitine est inconnu [37]. De plus, puisqu'il faut modifier génétiquement le modèle, il est impossible d'étudier des échantillons cliniques.

1.3.1.2. Utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine

La méthode développée par Vasilescu *et al.* afin d'éviter les désavantages de la transfection est simplement l'utilisation d'un anticorps anti-ubiquitine [38]. Le lysat cellulaire, traité par un inhibiteur du protéasome, est incubé avec des billes d'anticorps anti-ubiquitine. Suite à des lavages, les protéines liées sont éluées et analysées. Ainsi, tous les modèles biologiques peuvent être étudiés. Pour des études à grande échelle, cette approche est toutefois coûteuse car elle nécessite de grandes quantités d'anticorps. De plus, la purification a lieu en conditions natives, ce qui conduit aussi à la purification de protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées. Une façon de limiter la présence de ces protéines est d'effectuer la lyse en présence de 8 M d'urée pour briser les complexes protéiques suivi d'une renaturation en diluant l'échantillon à 4 M d'urée. Cette stratégie a été utilisée chez des cellules humaines et a permis l'identification de 345 protéines dans la condition dénaturante alors que 325 protéines sont identifiées seulement dans la condition native [39]. Ces dernières correspondent possiblement aux protéines associées aux protéines ubiquitinées.

1.3.1.3. Utilisation d'une protéine liant l'ubiquitine

Exploiter l'affinité naturelle des protéines liant l'ubiquitine constitue une méthode ne nécessitant aucune transfection et offrant de nombreuses possibilités. En

effet, ce concept peut utiliser plusieurs récepteurs d'ubiquitine, par exemple, Rpn10, Rad23 ou Dsk2 [40], [28]. Ces protéines possèdent différents domaines UBD. Cette méthode consiste à produire en bactéries une protéine de fusion avec la S-transférase glutathion (GST) en transformant les bactéries de façon à ce qu'elles expriment cette protéine de fusion. La protéine produite est ensuite purifiée sur billes glutathion en incubant le lysat bactérien avec ce type de billes ayant une forte interaction pour la GST. Par la suite, les protéines ubiquitinées d'un échantillon sont purifiées en incubant ces billes avec le lysat cellulaire.

Selon les caractéristiques de la protéine utilisée, les protéines ubiquitinées purifiées seront majoritairement des protéines polyubiquitinées modifiées par un certain type de chaînes d'ubiquitines, par exemple liées par la K48. Une grande attention doit toutefois être portée aux faux négatifs puisque des protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées seront aussi identifiées lors d'une purification en conditions natives. Afin de limiter les contaminations, cette stratégie peut aussi être couplée à l'utilisation d'une forme modifiée d'ubiquitine [28]. Ainsi, la première colonne, en conditions natives, enrichit spécifiquement les protéines ubiquitinées alors que la deuxième colonne se fait en conditions dénaturantes afin de réduire le nombre de protéines contaminantes.

1.3.1.4. Utilisation d'un domaine liant l'ubiquitine

Une variante de la stratégie précédente est d'utiliser seulement le domaine UBD et non la protéine complète. Dans certains cas, le domaine isolé aurait une affinité plus grande pour les protéines ubiquitinées [29]. Par contre, l'utilisation du domaine seul diminue la spécificité pour une structure de chaînes d'ubiquitines particulière. Cette méthode a été utilisée pour étudier l'ubiquitination chez la plante à l'aide du domaine UIM de l'homologue de Rpn10 [41]. Afin d'identifier les protéines co-purifiantes des protéines ubiquitinées, l'analyse se fait en comparant les protéines identifiées par une purification sur colonne d'affinité GST-Rpn10 avec celles identifiées sur colonne GST

seule. Les protéines identifiées dans les 2 échantillons sont donc considérées comme contaminantes.

Dans la présente étude, les stratégies de purification décrites aux sections 1.3.1.1 et 1.3.1.4 ont été utilisées.

1.3.2. Méthodes de séparation

Une fois l'échantillon enrichi en protéines ubiquitinées, sa complexité est très grande et une méthode de séparation est nécessaire avant son analyse en spectrométrie de masse. La technique classique de biologie moléculaire est l'utilisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Cette technique consiste à faire migrer, sous un champ électrique, les échantillons à travers un gel de polyacrylamide de porosité désirée en présence d'environ 0,1% dodécylsulfate de sodium (SDS) [42]. Le SDS est aussi inclus dans la préparation de l'échantillon et assure une charge constante par unité de masse en se liant sur les zones hydrophobes des protéines. Ainsi la séparation est reliée directement au poids moléculaire des protéines. Lorsque cette technique est utilisée, la digestion trypsique se fait à l'intérieur du gel. Les peptides possèdent des efficacités d'élution du gel variables ce qui constitue un désavantage. La séparation sur gel possède aussi une échelle dynamique limitée et n'est pas appropriée pour des protéines de hauts ou faibles poids moléculaires [43].

Le couplage de la chromatographie liquide capillaire au spectromètre de masse a permis l'analyse directe et avec une grande efficacité de mélanges protéiques complexes. Cette chromatographie peut se faire à une dimension (nanoLC-MS) ou à deux dimensions (nanoLC/LC-MS) [44]. Pour un échantillon d'une complexité réduite, la nanoLC-MS est suffisante. Par contre, pour un échantillon de grande complexité, une séparation orthogonale est nécessaire afin de mieux résoudre les peptides et d'augmenter la détection de peptides de faible abondance [44]. La chromatographie liquide à 2 dimensions (2D-LC) peut être réalisée en mode continu ou discontinu. Pour l'approche en continu, le mélange de peptides acidifiés est injecté sur une colonne

chromatographique échangeuse de cations à forte interaction (SCX) et les peptides sont élués par paliers vers la colonne de phase inverse (RP) en utilisant des solutions salines de concentrations croissantes. Les peptides sont ensuite élués de la colonne RP par un gradient d'acétonitrile et analysés par spectrométrie de masse en tandem [45]. Cette approche peut être complètement automatisée et la détection de protéines de faible abondance est améliorée comparativement à l'approche nanoLC-MS [44].

La chromatographie nanoLC/LC-MS en mode discontinu est réalisée en injectant le mélange acidifié de peptides sur une colonne SCX suivi d'une élution avec un gradient linéaire de solutions salines progressivement plus concentrées. Les fractions sont collectées habituellement à chaque minute pour être ensuite réduites en volume et analysées individuellement par LC-MS [45]. Cette technique possède plusieurs avantages notamment, une meilleure séparation des peptides par un gradient linéaire au lieu d'une élution multi-paliers de solutions salines et une possibilité de collecter plus de fractions.

1.3.3. Méthodes d'identification des sites d'ubiquitination

L'identification des protéines ubiquitinées présentes dans la cellule suite à certains traitements ou maladies apporte une compréhension certaine de ce système, néanmoins la détermination des sites d'ubiquitination précis permet une étude plus approfondie. La méthode traditionnelle pour identifier ces sites est longue et laborieuse puisqu'il s'agit de muter individuellement les acides aminés et de détecter l'effet sur la protéine [46], [47]. La spectrométrie de masse en tandem permet une analyse beaucoup plus rapide et efficace. De plus, l'identification du site d'ubiquitination est habituellement la stratégie adoptée pour confirmer l'ubiquitination des protéines identifiées lors d'étude à grande échelle d'un échantillon enrichi en protéines ubiquitinées [48].

L'identification du site d'ubiquitination par MS/MS se fait grâce à l'adduit diglycine (-GG) de l'ubiquitine sur la lysine modifiée du substrat suite à une digestion

trypsique (figure 1.8 a) [4]. De manière générale, la trypsine n'est pas en mesure de cliver le lien au niveau d'une lysine modifiée. Ainsi, cet adduit cause une augmentation de masse de 114,043 Da sur le peptide porteur du site. En ajoutant un site de défaut de coupure et une augmentation de masse sur une lysine dans les paramètres de recherche des spectres MS/MS, il est possible d'identifier les sites d'ubiquitination [49][47]. Il serait aussi possible d'observer un adduit plus long, -LRGG, provenant d'un deuxième défaut de coupure, cette fois au niveau de l'ubiquitine [50]. Il faut toutefois être prudent dans l'interprétation des résultats donnés par l'algorithme de recherche puisque de mauvaises identifications sont possibles. Il peut y avoir des erreurs dans l'assignation lorsqu'il y a plusieurs lysines à l'intérieur du peptide ou des résidus ayant une masse similaire à l'adduit -GG, par exemple isoleucine (113,2 Da), leucine (113,2 Da), asparagine (114,1 Da) ou acide aspartique (115,1 Da) situés près des extrémités du peptide (figure 1.8 b) [4].

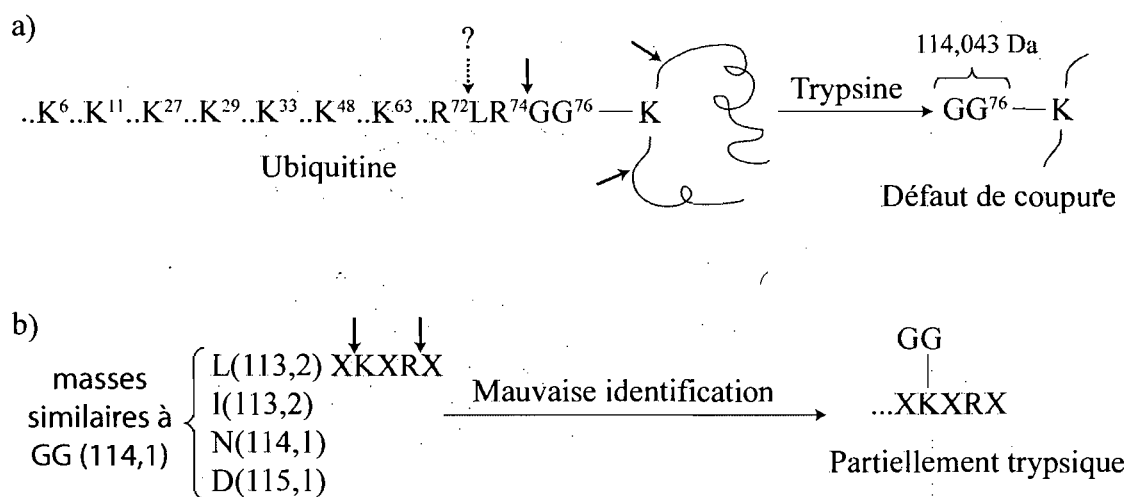


Figure 1.8 : Détermination des sites d'ubiquitination suite à une digestion tryptique. a) Défaut de coupure de la trypsine suite à la digestion d'une protéine ubiquitinée b) Erreurs d'assignation possibles de l'adduit diglycine causé par la présence d'acides aminés ayant une masse similaire à l'adduit diglycine. Où X représente un acide aminé quelconque et les flèches les sites de coupure tryptique (inspiré de [4]).

L'identification des sites d'ubiquitination demeure tout de même un défi puisque le peptide portant le site est en faible abondance parmi tous les peptides présents dans un échantillon enrichi. De plus, il est pratiquement impossible d'identifier 100% de la séquence par MS/MS et parfois, le peptide portant l'adduit diglycine n'est tout simplement pas séquencé [48]. En effet, lors d'une étude à grande échelle chez la levure, un faible nombre de peptides avec le motif –GG ont été séquencés. Ces peptides correspondaient à seulement 10% des protéines identifiées [9]. Quelques stratégies sont disponibles pour faciliter la détection des peptides modifiés.

D'abord, il est possible de dériver chimiquement les extrémités N-terminales des peptides par une sulfonation avec un groupement 4-sulfophényl-isothiocyanate (SPITC) [51]. L'analyse MS/MS d'un peptide tryptique portant un adduit –GG et ayant subi une sulfonation révèle une distribution spécifique de fragments. Le spectre est composé de fragments signatures de l'adduit diglycine et des fragments courants permettant le séquençage du peptide et la localisation du site d'ubiquitination [52]. Par contre, cette approche n'a été démontrée que pour des peptides synthétiques jusqu'à maintenant, de plus, l'efficacité de dérivation varie selon les peptides.

Les différents instruments hybrides permettent aussi d'améliorer la détermination des sites d'ubiquitination. Par exemple, la très grande résolution du spectromètre de masse à résonance ionique cyclotronique à Transformée de Fourier (FT-ICR) est utilisée pour identifier des sites d'ubiquitination par injection directe. L'approche a été démontrée à l'aide d'un mélange tryptique simple [46]. De plus, une analyse ciblée par multiples fragmentations sélectives (MRM) sur un spectromètre de masse triple quadrupôle pourrait apporter une solution. En effet, l'utilité d'une analyse MRM dans l'identification des sites ubiquitinés a été démontrée à l'aide d'une protéine ubiquitinée *in vitro* [53]. À partir de la séquence de la protéine, un logiciel spécialisé, le MIDAS Workflow Designer, génère toutes les transitions MRM possibles pour des peptides ubiquitinés. Ainsi, lorsque l'instrument détecte un signal MRM de cette liste, un spectre MS/MS est enregistré. L'identification des sites est donc facilitée. Par contre, cette approche n'a été démontrée que sur une seule protéine.

Pour résumer, la spectrométrie de masse est une méthode très efficace pour étudier les protéines ubiquitinées à l'échelle du protéome et identifier leurs sites de modification. Malgré cela, la faible abondance des protéines ubiquitinées dans la cellule nécessite l'utilisation de différents inhibiteurs ainsi que des stratégies de purification. L'utilisation d'une forme modifiée de l'ubiquitine, l'utilisation d'anticorps ou de protéines possédant des domaines liant l'ubiquitine permettent d'augmenter la proportion de protéines ubiquitinées dans un échantillon. Le choix de la méthode dépend toutefois du type de modèle biologique étudié, de la quantité de protéines disponible ainsi que de l'objectif précis de l'étude. La spectrométrie de masse permet aussi d'identifier les sites d'ubiquitination, par contre, le taux d'identification est relativement faible jusqu'à ce jour. La spectrométrie de masse s'est tout de même révélée être un outil indispensable pour la caractérisation en profondeur de l'ubiquitination des protéines [4].

1.4. Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse (MS) est un instrument qui permet de déterminer la masse moléculaire et la structure des protéines, drogues, macromolécules et oligonucléotides [54]. Par définition, un spectromètre de masse est formé d'un système d'introduction de l'échantillon, d'une source d'ion, d'un analyseur de masse et d'un détecteur (figure 1.9) [55]. Après ionisation dans la source, les ions voyagent vers l'analyseur de masse et sont séparés selon leur rapport masse sur charge (m/z). Les ions atteignent ensuite le détecteur dont le rôle est de convertir ce courant ionique en un signal mesurable afin de générer les spectres m/z [56]. L'ionisation par nébulisation électrostatique (ESI) et l'ionisation par désorption laser avec matrice (MALDI) sont les deux techniques d'ionisation les plus courantes pour les protéines et les peptides [55].

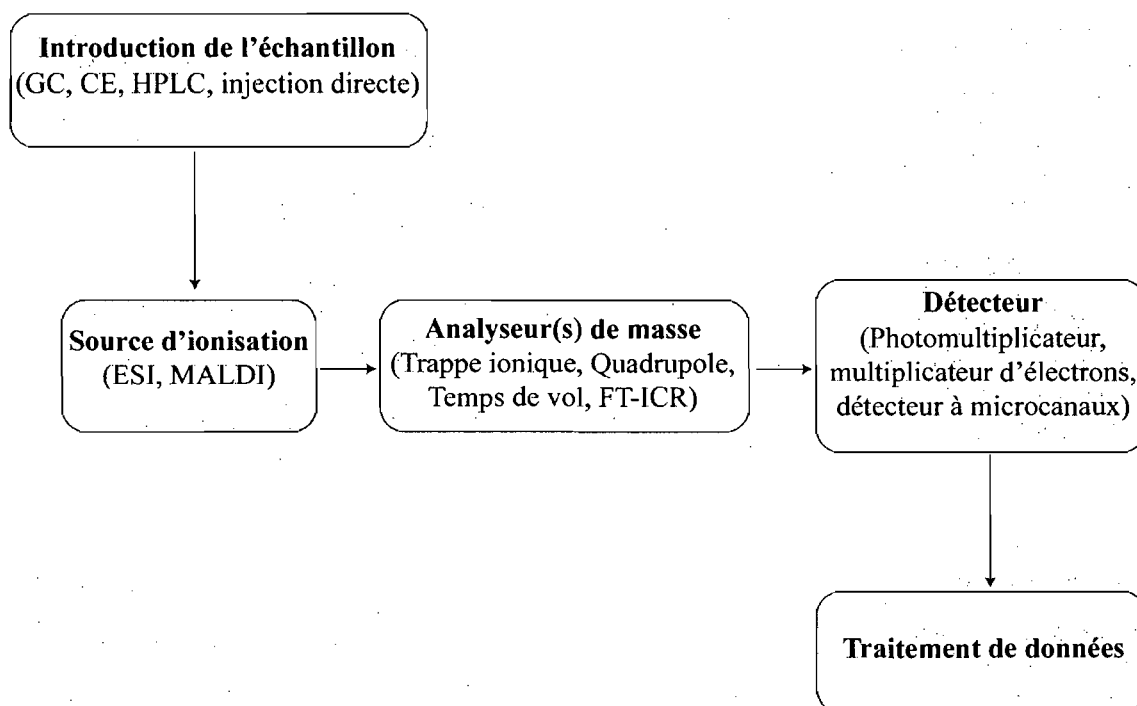


Figure 1.9: Composantes principales d'un spectromètre de masse.

L'approche protéomique courante pour des mélanges peu complexes consiste à digérer les protéines et à séparer par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) les peptides résultants sur une colonne de phase inverse C₁₈ directement reliée au spectromètre de masse. L'enzyme la plus couramment utilisée lors des études protéomiques à grande échelle est la trypsine [55]. Cette protéase est très spécifique et brise le lien peptidique à l'extrémité C-terminale de l'arginine et de la lysine sauf s'ils sont suivis d'une proline [57]. Finalement, les peptides sont ionisés et séquencés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) [58]. En effet, les spectromètres de masse combinant plusieurs analyseurs en série permettent d'obtenir un spectre de masse résultant de la fragmentation d'un ion sélectionné dans le premier analyseur, plus communément appelé spectre de fragments [56]. Plusieurs spectromètres de masse hybrides sont disponibles commercialement, notamment, le quadrupôle triple, l'hybride quadrupôle triple / trappe ionique linéaire (Q-Trap), l'hybride quadrupôle / temps de vol (Q-TOF), l'hybride ionisation par désorption laser avec matrice / temps de vol (MALDI-TOF), résonance ionique cyclotronique à Transformée de Fourier (FT-ICR) ainsi que l'hybride quadrupôle trappe ionique linéaire / Orbitrap (LTQ-Orbitrap). Chacun de ses

instruments possède des avantages ainsi que des applications dans le domaine de la spectrométrie de masse.

1.4.1. Ionisation par nébulisation électrostatique

L'ionisation par nébulisation électrostatique (ESI) est la méthode de choix pour l'analyse de mélanges complexes [55]. Cette technique d'ionisation à pression atmosphérique a été développée par Fenn *et al.* pour les petites molécules et par la suite pour les protéines [59]. L'ESI ne nécessite aucun tampon ou matrice et cet avantage a permis son couplage avec l'électrophorèse capillaire et les techniques de chromatographie à haute pression (HPLC) [60].

L'interface à pression atmosphérique d'une source ESI est formée d'un capillaire sur lequel est appliqué un voltage élevé (2-3 kV) (figure 1.10) [61]. L'application de ce champ électrique conduit à la formation d'un fin pinceau de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire appelé cône de Taylor. Il y a ensuite évaporation du solvant et collision avec les molécules environnantes ce qui cause une diminution de la taille des gouttelettes et donc une accumulation de charges. Une explosion coulombique survient lorsque la micro-gouttelette atteint la limite de Rayleigh, c'est-à-dire au moment où les forces associées au champ électrostatique sont supérieures aux forces de cohésion maintenant l'intégrité physique de la gouttelette [56].

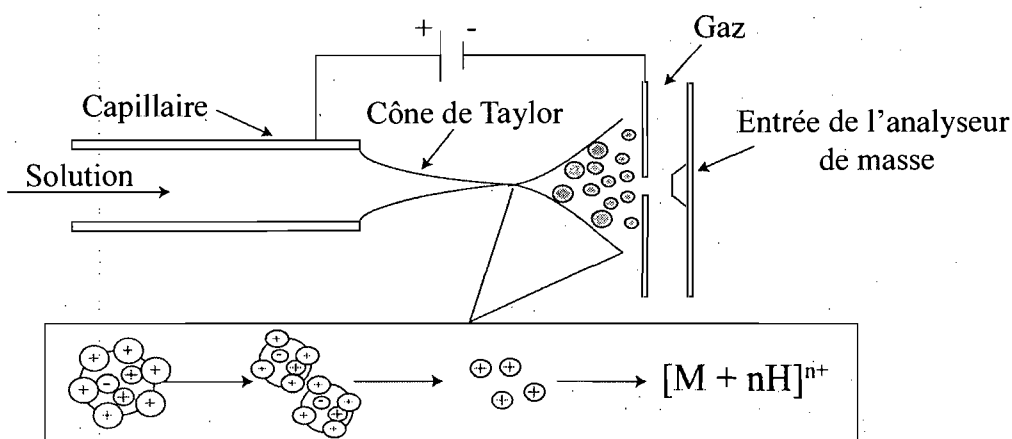


Figure 1.10 : Principe de l'ionisation par nébulisation électrostatique.

L'efficacité de l'ionisation dépend du voltage appliqué, du débit de l'échantillon et de la taille de l'émetteur. Cette source conventionnelle a été l'inspiration pour la mise au point d'une source d'ions par nébulisation nano-électrostatique dans lequel le débit de l'échantillon est de 600 nL/min et l'orifice du capillaire est de 20 μm . Ces caractéristiques réduisent la taille des gouttelettes et augmentent ainsi l'efficacité d'ionisation de 2 ordres de grandeur comparativement aux sources ESI conventionnelles [59]. De façon générale, l'ionisation par nébulisation électrostatique produit des ions multiplement chargés en continu et peut être couplée à une multitude d'analyseurs de masse.

1.4.2. Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap

Les avancées de la recherche dans les domaines de la protéomique et de la biologie en général requièrent des MS toujours plus puissants mais ayant un coût abordable et de faibles contraintes logistiques. Ainsi, les progrès rapides dans le domaine de la protéomique dépendent de la performance des spectromètres de masse. Récemment, Makarov *et al.* ont mis au point le LTQ-Orbitrap, un instrument hybride qui combine une précision de masse de l'ordre du ppm et une haute résolution, le tout compatible avec l'échelle de temps d'une séparation de nano-chromatographie liquide (nano-LC) [62]. La partie Orbitrap est une trappe électrostatique formée d'électrodes centrale et externe sur laquelle est appliquée une différence de potentiel (figure 1.11) [63].

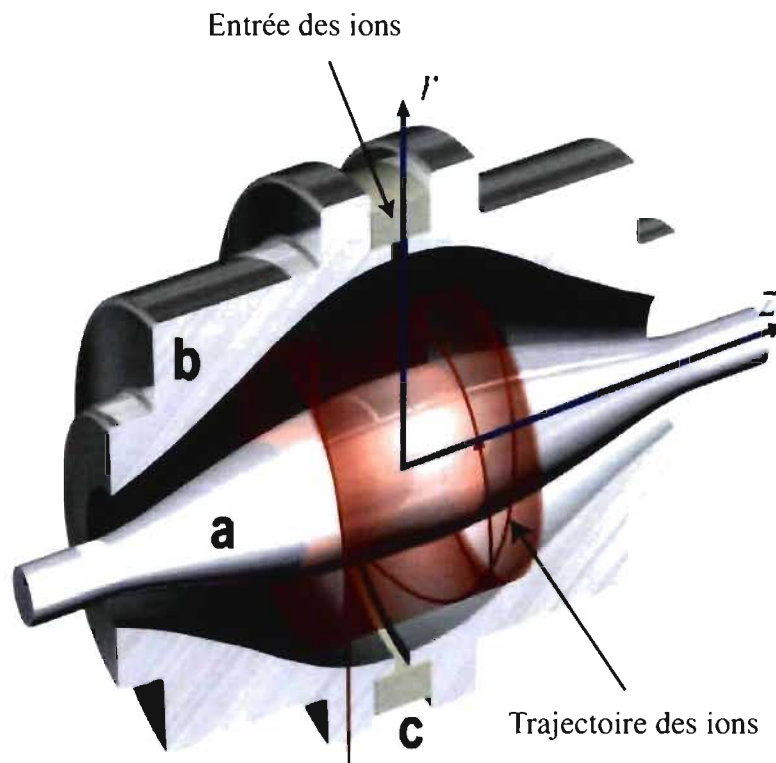


Figure 1.11 : Vue en coupe de l'analyseur de masse Orbitrap. Électrode centrale (a), électrode externe (b), anneau de céramique isolante (c) [62].

Les ions sont injectés avec une certaine vitesse perpendiculairement à l'axe de l'électrode centrale et ils entrent alors en un mouvement formé d'oscillations axiales et de rotations autour de l'électrode centrale. Des ions de même rapport m/z vont osciller ensemble le long de l'axe z et le demeurer pour de nombreuses oscillations [64]. La fréquence de ces oscillations axiales (ω) est liée au rapport m/z et à une constante (k) selon l'équation suivante :

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right)k} \quad \text{Équation 5.1}$$

Le courant induit par ces ions est mesuré différentiellement entre les deux moitiés de l'électrode externe. Une transformée de Fourier est ensuite utilisée pour convertir ce courant image en fréquences, dont sont déduites les masses, et en intensités. Ce traitement mathématique permet ainsi de produire le spectre de masse [62].

Ce concept permet à l'Orbitrap d'avoir une précision de masse et une haute résolution similaire au FT-ICR [62]. L'Orbitrap possède une précision de masse de moins de 2 ppm, une grande gamme dynamique (~5000) et une résolution de 100 000 pour un m/z de 400 [62],[65].

Le couplage de l'Orbitrap avec une trappe linéaire quadripolaire (LTQ) permet d'avoir un instrument rapide et de haute résolution pour les spectres MS et d'une grande sensibilité pour les spectres MSⁿ [62]. L'instrument hybride résultant est appelé un LTQ-Orbitrap (figure 1.12).

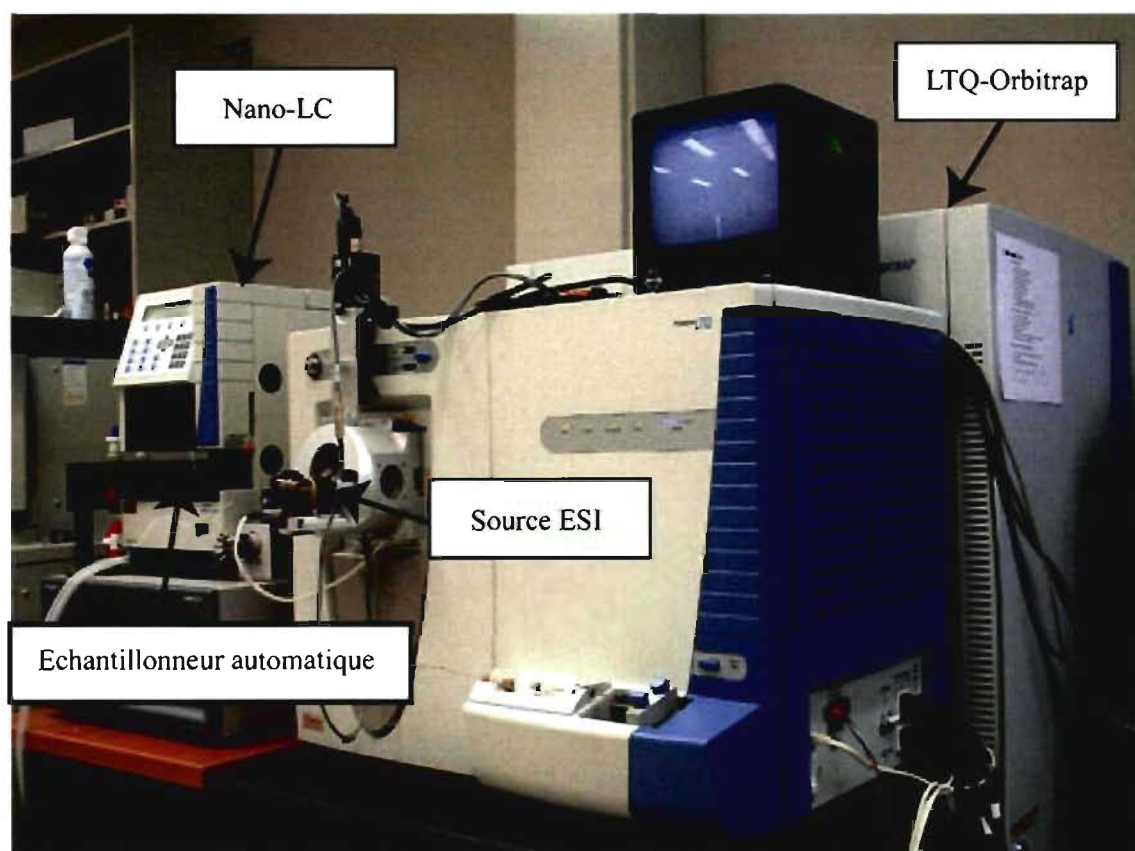


Figure 1.12 : Spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Electron) couplé à un système nano de chromatographie liquide (Eksigent) avec un échantillonneur automatique Spark-Holland (Thermo Electron).

Cet instrument est composé de 3 éléments majeurs : la trappe ionique linéaire quadripolaire, la trappe C et l'analyseur de masse Orbitrap (figure 1.13). La configuration habituellement utilisée pour des études protéomiques est la suivante : les spectres MS/MS sont enregistrés par la trappe ionique linéaire à raison de 3 à 5 spectres par secondes alors qu'un spectre MS de haute résolution est acquis pour chacun des précurseurs dans l'Orbitrap [62]. La trappe C est utilisée comme lieu de remplissage d'ions d'intérêt par la trappe linéaire avant l'injection dans l'Orbitrap [65].

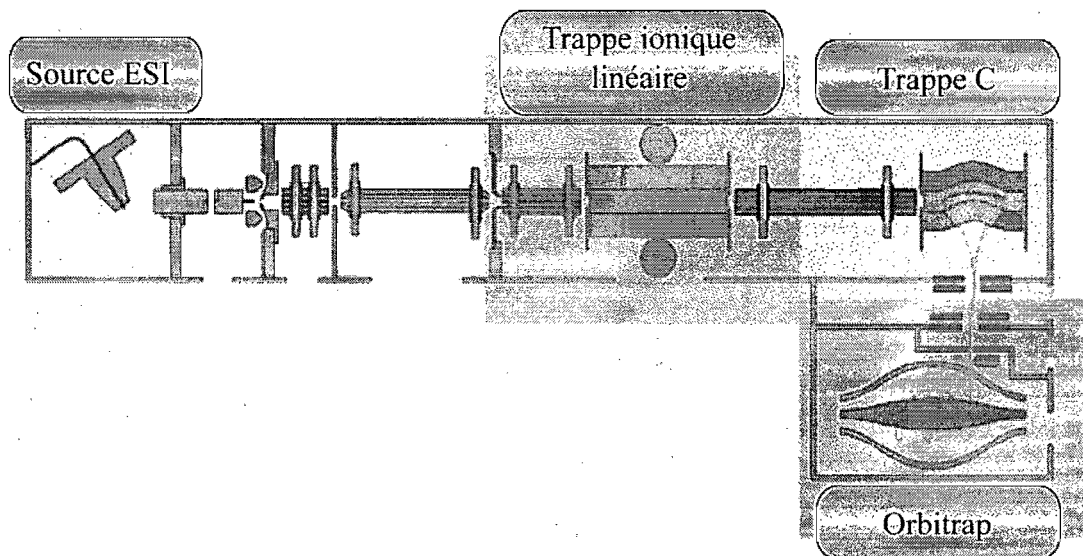


Figure 1.13 : Schéma des composantes du LTQ-Orbitrap [62].

1.4.3. Spectrométrie de masse en tandem

Les applications de la spectrométrie de masse sont multiples, notamment pour élucider la structure de composés chimiques, déterminer des compositions élémentaires et bien sur, déterminer la séquence d'un peptide [56]. Brièvement, cela consiste à isoler un ion d'intérêt, l'ion précurseur, dans un analyseur et à lui faire subir une fragmentation qui produira des ions et des fragments neutres. Cette fragmentation est normalement déclenchée par collision avec un gaz neutre inerte, par exemple l'azote ou l'argon [66]. L'ion absorbe l'énergie cinétique ce qui induit le bris des liens peptidiques et conduit à la formation d'ions. Ces fragments sont ensuite séparés selon leur rapport m/z par l'analyseur de masse ce qui produit un spectre MS/MS de l'ion précurseur fragmenté [54].

Les 3 liens peptidiques (NH-CH, CH-CO et CO-NH) peuvent fragmenter selon les paramètres du spectromètre de masse. Lors de la rupture du lien, 2 fragments sont créés dont l'un porte une charge positive et l'autre est neutre. La charge sera conservée par la plus nucléophile des 2 espèces [54]. Il y a donc 6 fragmentations possibles : les ions a, b et c lorsque la charge est retenue sur l'extrémité N-terminale et x, y et z lorsque la charge est retenue sur l'extrémité C-terminale. Puisque la fragmentation des ions de types b et y requière moins d'énergie, ces ions sont les plus fréquemment observés (figure 1.14) [54].

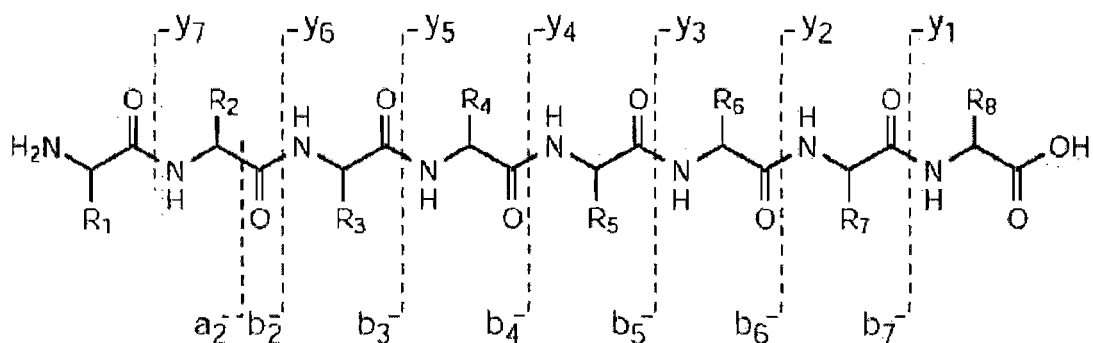


Figure 1.14 : Formation des ions y et b par fragmentation des peptides à basse énergie de collision [66].

Les spectres MS/MS peuvent être interprétés manuellement ou à l'aide de différents algorithmes, tels Mascot, Sequest et ProteinProspector, qui tentent de trouver une correspondance entre les ions produits et ceux de spectres MS/MS théoriques provenant de banques de données de protéines [66]. Le succès de l'interprétation manuelle ou séquençage *de novo* dépend beaucoup de la résolution et de la précision de masse de l'instrument utilisé.

1.4.4. Traitement des données menant à l'identification des protéines

1.4.4.1. Recherche dans les bases de données à l'aide de Mascot

Chaque analyse par spectrométrie de masse génère une quantité importante de spectres MS/MS et différents outils bioinformatiques ont été développés afin d'identifier

les peptides correspondants [67]. Mascot, développé par Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>), est un de ces outils couramment utilisés dans les études protéomiques pour interpréter les spectres MS/MS [66]. Le principe de Mascot consiste à comparer le patron de fragmentation théorique de chaque peptide contenu dans une base de données avec le spectre MS/MS observé lors de l'analyse [68]. La séquence peptidique résultante est accompagnée d'un score selon le niveau de confiance de l'algorithme qui considère différents facteurs tels la précision de masse et la résolution des spectres. Avant de débiter la recherche Mascot, l'utilisateur doit définir des paramètres de l'expérience afin de minimiser le taux de faux positifs, spécialement pour les analyses protéomiques à grande échelle (figure 1.15).

MASCOT MS/MS Ions Search

The screenshot displays the Mascot MS/MS Ions Search web interface. The form includes the following fields and options:

- Your name:** [Text input field]
- Email:** [Text input field]
- Search title:** [Text input field]
- Database:** IPI_human_fr [Dropdown menu]
- Taxonomy:** All entries [Dropdown menu]
- Enzyme:** Trypsin [Dropdown menu]
- Allow up to:** 1 missed cleavages [Dropdown menu]
- Fixed modifications:**
 - Acetyl (K)
 - Acetyl (N-term)
 - Amide (C-term)
 - Biotin (K)
 - Biotin (N-term)
- Variable modifications:**
 - Glutathione (C)
 - Glyc-Asn (N)
 - GlyGly (K)
 - GN180labeling (N)
 - Gygi_ICATd0 (C)
- Protein mass:** [Text input field] kDa
- ICAT:** ☐
- Peptide tol. ±:** 0.05 Da [Dropdown menu]
- MS/MS tol. ±:** 0.5 Da [Dropdown menu]
- Peptide charge:** 1+, 2+ and 3+ [Dropdown menu]
- Monoisotopic:** ☒ **Average:** ☐
- Data file:** [Text input field] **Browse...** [Button]
- Data format:** Mascot generic [Dropdown menu]
- Precursor:** [Text input field] m/z
- Instrument:** ESI-TRAP [Dropdown menu]
- Overview:** ☐
- Report top:** AUTO hits [Dropdown menu]
- Start Search ...** [Button]
- Reset Form** [Button]

Figure 1.15 : Page de recherche de l'outil Mascot illustrant les différents paramètres de recherche à fixer.

La première étape consiste à soumettre au serveur Mascot le fichier de tous les spectres MS/MS des analyses contenant les ions fragments avec leur m/z, leurs temps de rétention et leurs intensités. Il est possible de créer un fichier contenant toutes les

fractions d'une analyse par 2D-LC. Ensuite, la base de données appropriée est sélectionnée parmi les choix : MSDB, IPI (International Protein Index), Swiss Prot et Centre national de l'information biotechnologique (NCBI), et l'espèce est déterminée selon l'expérience. Chaque base de données possède des caractéristiques propres, par exemple la base de données Swiss Prot est formée d'environ 12 000 entrées et possède un faible niveau de redondance parmi les séquences alors que celle de NCBI est formée de plus de 115 000 séquences mais a un haut degré de redondance [67]. La base de données IPI a été choisie pour le projet présenté ici puisqu'elle possède le meilleur compromis concernant le niveau de redondance associé au nombre de séquences soit environ 49 000. L'utilisateur doit aussi définir l'enzyme de digestion utilisée lors de la préparation de l'échantillon, le nombre de défaut de coupure permis ainsi que les modifications fixes et variables. Finalement, la précision de l'analyseur de masse pour les spectres MS et MS/MS est choisie afin de fixer une échelle de tolérance sur la masse et ainsi avoir un niveau de confiance sur le peptide identifié. Le résultat fourni par Mascot consiste en une liste de peptides avec la protéine correspondante, la valeur m/z , la charge, le temps de rétention et le score Mascot.

Globalement, Mascot constitue un outil rapide et efficace pour l'identification de protéines à grande échelle. Il faut toutefois interpréter la liste de protéines prudemment puisqu'un même peptide peut appartenir à des protéines ou isoformes différents et qu'il y a parfois une grande homologie de séquence entre 2 peptides [67]. De plus, certains peptides ne seront pas assignés car leurs spectres MS/MS sont de faible intensité ou il y a eu substitution d'acides aminés dans leur séquence ou présence d'une modification post-traductionnelle inhabituelle. Il y a aussi un certain taux d'identifications erronées puisque le meilleur candidat selon Mascot n'est pas nécessairement le vrai peptide. Toutefois, il est possible de déterminer le taux de faux positifs associés aux résultats à l'aide de l'approche des bases de données normales et inversées [68]. Le principe est simple et il consiste à créer une base de données formée des séquences peptidiques de la base de données normales et inverses où, pour chaque peptide, l'ordre des acides aminés est inversé, l'extrémité C-terminale devenant l'extrémité N-terminale [45]. Ainsi, les identifications aléatoires (faux positifs) devraient être présentes avec la même fréquence

dans les bases de données normale ou inversée. De là, il est possible de calculer le taux de faux positifs : $FP = \text{nombre de peptides assignés dans la base de données inverse} / \text{nombre de peptides assignés dans la base de données normale}$ [69].

1.4.4.2. Regroupement et alignement des peptides à l'aide de MassSense

La protéomique s'intéresse fréquemment à comparer les changements d'abondance des protéines d'un système afin de donner une vue générale de l'expression des protéines dans la cellule suite à une maladie ou à un traitement chimique. Ceci nécessite des analyses précises et sensibles ainsi qu'une quantification de l'abondance des protéines [70]. Pour ce faire, il existe différentes méthodes basées sur des mesures relatives ou absolues et impliquant ou non une dérivation. MassSense est une suite de logiciels bioinformatiques qui permettent la détection de peptides non dérivés ainsi que des analyses de regroupements similaires à travers des jeux de données de LC-MS ou LC/LC-MS sur différents spectromètres de masse [71].

Les étapes suivies par MassSense sont les suivantes : d'abord les pics sont détectés dans chaque spectre de masse, ensuite ils sont regroupés à partir des spectres de masse consécutifs sur la base de leur profil d'élution, les ions isotopiques d'un même peptide sont regroupés et finalement les peptides candidats sont sélectionnés [71]. De cette façon, des cartes peptidiques avec 4 coordonnées : rapport m/z , temps de rétention (Tr), charge (z) et abondance pour chaque peptide candidat sont créés (figure 1.16).

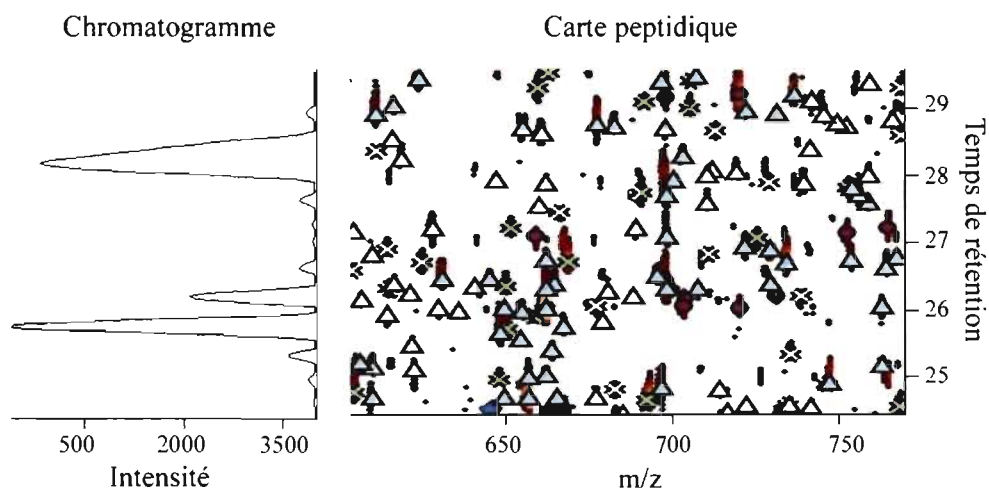


Figure 1.16 : Carte peptidique générée par MassSense à partir des données brutes du MS. L'intensité des peptides est représentée par un gradient de couleurs allant du jaune (forte abondance), au noir (faible abondance). Les charges des peptides sont représentées par différents symboles : le cercle correspond aux ions simplement chargés, la croix correspond aux doublements chargés, le triangle aux triplements chargés, le carré aux quadruplements chargés et le pentagone aux quintuplements chargés.

De plus, un fichier excel des valeurs m/z , Tr, intensités et scores MassSense pour chaque peptide est généré. La validation manuelle de cette approche a permis de déterminer un taux de faux positifs et de faux négatifs de 7,4% et 4,2% respectivement. Les erreurs de détection sont généralement attribuées à des peptides co-éluant et donc pas complètement résolus et à de mauvaises identifications de charges. Ainsi, MassSense permet de détecter des changements d'abondance statistiquement valables à travers des répliquats et différentes conditions. Cet outil se révèle donc utile pour la création de profil d'expression conduisant à une meilleure compréhension des changements d'abondance peptidiques entre différents échantillons biologiques.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les solvants utilisés sont tous de pureté HPLC ou supérieure. L'acétonitrile et l'éthanol ont été achetés de la compagnie Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). L'acide formique (FA) et l'acide acétique ont été obtenus de la compagnie EM Science (Mississauga, Ontario, Canada). Le dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide, l'imidazole, l'urée, le carbobenzoxy-leuciny-leuciny-leucinal (MG132), le *N*-éthylmaléide (NEM), la pepstatine A (PepA), le fluorure de phénylméthanésulfonyle (PMSF), le fluorure de sodium (NaF), le chlorure de sodium (NaCl), le β -glycérophosphate, le thiosulfate de sodium (Na_2SO_3), le nitrate d'argent (AgNO_3), le carbonate de sodium (Na_2CO_3), la solution aqueuse 37% formaldéhyde (formaline), acide 4-2(hydroxyethyl)pipérazine-1-éthanesulfonique (HEPES), SDS, bicarbonate d'ammonium (NH_4CO_3), Tween, ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), acétate d'ammonium, tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris), acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA), TCEP, le formate d'ammonium (NH_4HCO_2) et le triton ont été achetés de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). La leupeptine (Leu), l'ampicilline et le chloramphénicol ont été obtenus de la compagnie Calbiochem (Mississauga, Ontario, Canada). Les milieux de culture Eagle, modifié selon Dubelco, haute teneur en glucose (DMEM+) et HyQ DMEM, le sérum fœtal de bovin (FBS), la solution pénicilline – streptomycine ainsi que la L-glutamine ont été achetés de la compagnie HyClone (Perbio, Nalgene). Le tampon Laemmli provient de Bio-Rad, l'isopropylthio- β -galactoside (IPTG) et le β -mercaptoéthanol d'Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada). Les billes de Ni-NTA Agarose ont été achetées de la compagnie Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada). La trypsine Promega est achetée de Fisher Scientific. Les capillaires de silice fusionnée sont achetés de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Les particules de Jupiter C₁₈, 3 μm sont de Phenomenex (Torrance, CA) et la résine échangeuse de cations à forte interaction provient de PolyLC (Columbia, MD).

2.2. Méthodes

2.2.1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire embryonnaire humaine rénale HEK 293 (ATCC, Manassas, VA, É-U) est cultivée dans du milieu DMEM+ contenant 10% FBS supplémenté avec 1% Peniciline-Streptomycine et 1% L-glutamine, à 37 °C dans une atmosphère de 5% CO₂. Le traitement au MG132 est fait lorsque les cellules sont en phase de croissance exponentielle avec 25 µM pour différents temps d'incubation ou 10 µM pendant 12 h.

La lignée cellulaire EL4 (acquise de R. Glas, Karolinska University Hospital, Huddinge, Sweden) est cultivée en suspension dans un milieu HyQ DMEM contenant 10% FBS et 1% Peniciline-Streptomycine et 1% L-Glutamine, à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂. Le traitement au MG132 est fait tel que décrit précédemment pour les cellules HEK 293.

2.2.2. Purification des protéines liant l'ubiquitine

Les plasmides GST-Rad23, GST-Dsk2 et GST-Rpn10 ont été généreusement donnés par Dr Stefan Jentsch (Max Planck Institute of Biochemistry, Munich, Allemagne). Ces plasmides sont d'abord transformés par un choc thermique à 42°C dans des bactéries *E. coli* BL21 sans endoprotéases. Les bactéries sont ensuite ensemencées sur pétri ampicilline et incubées à 37°C pendant 14 h afin de sélectionner seulement les bactéries ayant intégré le plasmide. Le lendemain, une colonie est ensemencée dans 30 mL milieu LB (Luria Broth Base, Invitrogen) contenant 100 µM d'ampicilline et 34 µM de chloramphénicol et incubée à 37°C pour 14 h. Cette pré-culture est par la suite diluée 1/50 et incubée à 37°C. Des aliquots sont ensuite prélevés à différents intervalles de temps jusqu'à ce que leur absorbance à 600 nm atteigne une valeur entre 0,4 et 0,7. Lorsque cette valeur est atteinte, la production de la protéine de fusion est induite par l'ajout d'IPTG (isopropylthio-β-galactoside, Invitrogen) à 200 µM à température ambiante pendant 14 h. Les cultures sont finalement centrifugées à 3750

rpm pendant 10 min et les culots sont conservés. Ces culots sont resuspendus dans un tampon bactérie (16 mL par 500 mL de culture initiale) (10 mM Tris-HCl pH 7,2, EDTA 2 mM, PBS 1X, leupeptine, PMSF, pepstatine A). Une solution de Triton 10% est ajoutée afin d'avoir une concentration de 1% et la solution est congelée à -80°C. Une fois congelé, l'échantillon est réchauffé à température ambiante et une solution de sarcosyl 10% (Sigma-Aldrich) est ajoutée afin d'avoir une concentration finale de 1 à 1,5%. Ce cycle de congélation / réchauffement est réalisé à 2 reprises. La solution est ensuite soniquée à 4°C jusqu'à ce qu'elle soit à peine visqueuse. Elle est ensuite centrifugée à 3750 rpm à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est conservé et incubé avec des billes de glutathion-sépharose 4B (Amersham Bioscience, Baie d'Urfée, Québec, Canada) à 4°C pendant 2 h sous agitation. Les billes sont lavées et déposées sur gel SDS-PAGE pour évaluer la pureté des protéines produites.

Les protéines purifiées sont éluées des billes glutathion à l'aide d'un tampon 100 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM glutathion (Sigma-Aldrich), 150 mM NaCl et 0,2% Triton. L'éluat contenant les protéines de fusion est dialysé pendant 14 h contre un tampon 50 mM HEPES et 100 mM NaCl dans des sacs à dialyse (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) ayant un filtre moléculaire de 3,5 kDa.

2.2.3. Couplage covalent sur billes Affi-gel 15

D'abord, les protéines de fusion dialysées sont concentrées sur un filtre moléculaire à 5 kDa de type centricon (Millipore, Fisher Scientific). La solution est ensuite incubée avec les billes Affi-Gel 15 (Biorad) dans un tampon aqueux HEPES (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 8) à 4°C pendant 4 h selon un ratio 1:1 (volume/volume) sous agitation. Suite à l'incubation, la fraction de protéines non liée est conservée et 5 lavages des billes avec du tampon HEPES sont effectués. Les protéines contenues dans la fraction non liée ainsi que tous les lavages sont dosées par spectroscopie selon la méthode microBCA (Pierce, Rockford, IL). Ainsi, le rendement de couplage est calculé en soustrayant la quantité de protéines récupérées dans les lavages de la quantité de protéines de départ.

2.2.4. Préparation des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23

Les cellules sont lysées dans le tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% v/v Triton, inhibiteurs de protéases (1 μ M PepA, 1 μ M Leu, 100 μ M PMSF) et 10 mM NEM). Les extraits cellulaires obtenus sont incubés avec GST, GST-Rpn10, GST-Rad23 ou GST-Dsk2 sur billes selon un ratio 1 : 50 à 4°C pendant 3 h. Les billes sont ensuite lavées avec le tampon de lavage (tampon de lyse contenant 200 mM ou 500 mM ou 1 M ou 2 M de NaCl). L'élution se fait ensuite avec 4 fois le volume de la colonne avec le tampon d'élution approprié soit 0,3% SDS, 2 M urée ou 0,1 M Glycine pH 2,5 (Invitrogen). Pour les essais d'optimisation, l'éluat est bouilli dans un tampon Laemmli et déposé sur gel suivi d'immunobuvardage. Pour les essais à grande échelle, l'éluat est conservé et un changement de tampon est réalisé sur filtre moléculaire de 5 kDa (Millipore). Le nouveau tampon est approprié pour la digestion trypsique soit 50 mM NH_4CO_3 pH 8,0. Les échantillons sont d'abord réduits en les incubant à 37°C en présence de TCEP à 0,5 mM pendant 20 min suivi d'une alkylation en présence de 5 mM d'iodoacétamide à 37°C pendant 20 min. On ajoute ensuite 5 mM de DTT pour neutraliser l'excès d'iodoacétamide suivi de la digestion trypsique selon un ratio 1 : 50 à 37°C pour la nuit. Les échantillons sont séchés et conservés à -30°C jusqu'à l'analyse au spectromètre de masse.

2.2.5. Préparation des échantillons enrichis sur billes de Ni-NTA

Les cellules HEK 293 sont transfectées de façon transitoire par la méthode de précipitation au phosphate de calcium avec 24 μ g d'un plasmide d'ADN codant pour la protéine 6xHis-ubiquitine par pétri de 15 cm (plasmide généreusement donné par Dr Annie Angers, Département de biologie, Université de Montréal). Les cellules sont incubées avec la solution de transfection pendant 12 h. Le traitement au MG132 (Sigma Aldrich, 10 μ M pendant 12h) est réalisé 24 h après la transfection. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon Foz⁻ (50mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 40 mM β -Glycerophosphate, 1% Triton, inhibiteurs de protéases (1 μ M PepA, 1 μ M Leu, 100 μ M PMSF) et 10 mM NEM). Les lysats sont dosés par la méthode

microBCA. Une solution d'imidazole 1M est ajoutée à 40 mg de lysat afin d'avoir une concentration finale de 20 mM. Ce lysat est ensuite incubé avec 400 μ L de billes de Ni-NTA Agarose pendant 4h sous agitation à 4°C. Une fois l'incubation terminée, les billes sont lavées avec un tampon Foz⁻ contenant 40 mM et 75 mM d'imidazole. Le dernier lavage est effectué avec un tampon TBS (tampon salin Tris : 50 mM Tris pH 7,5 ; 150 mM NaCl). Les protéines liées par les billes sont ensuite éluées par des lavages avec des tampons contenant une concentration croissante imidazole (40, 75, 150 et 300 mM) dans un tampon TBS. Pour les analyses sur gel, l'éluat est bouilli dans un tampon Laemmli et déposé sur gel suivi d'immunobuvardage ou d'une coloration à l'argent. Pour les analyses MS, l'éluat est concentré sur des filtres moléculaires de 30 kDa (Amicon) et le tampon est remplacé par un tampon 50 mM NH₄CO₃. Les échantillons sont finalement réduits par une réaction à 37°C en présence de 0,5 mM TCEP pendant 20 minutes, suivi d'une alkylation en présence de 5 mM d'iodoacétamide dans les mêmes conditions. Finalement, 5 mM de DTT sont ajoutés suivi de la digestion trypsique à un ratio 1 : 50 à 37°C sous agitation pour la nuit.

2.2.6. Préparation des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23 suivie des billes de Ni-NTA

Le lysat cellulaire de HEK 293 transfectées avec 6xHis-ubiquitine (120 mg) est obtenu et incubé avec les billes Rad23 tel que décrit précédemment. Une fois les lavages complétés, l'élution se fait grâce à un tampon 8 M urée à température ambiante sous agitation. L'éluat est ensuite incubé avec 500 μ L de billes de Ni-NTA sous agitation à 4°C pendant 2 h. Les billes sont lavées, éluées et la digestion trypsique est réalisée tel que décrit précédemment ou l'échantillon est bouilli dans du tampon Laemmli et déposé sur gel suivi d'immunobuvardage ou d'une coloration à l'argent.

2.2.7. Digestion par le domaine catalytique de USP2

Les échantillons sont d'abord enrichis selon la procédure décrite pour la colonne d'affinité de Rad23. Les billes sont ensuite lavées dans un tampon 50 mM NH₄CO₃. Le

domaine catalytique de USP2, un don généreux de Dr Simon Wing (Département de médecine, Université McGill), est ajouté à l'échantillon selon un ratio de 1 : 10 et incubé pendant 2 h à 37°C sous agitation. L'échantillon est finalement bouilli dans un tampon Laemmli 3X et déposé sur gel suivi d'un immunobuvardage pour les essais à petite échelle. Pour les échantillons analysés par spectrométrie de masse, la digestion trypsique est réalisée suite à la déubiquitination, tel que décrit précédemment.

2.2.8. Analyse par immunobuvardage

Les échantillons ont été déposés sur un gel de 14 cm x 16 cm de 7,5% polyacrylamide et la migration est réalisée à 8 mA pendant 16 h. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (VWR) à 600 mA pendant 1h30 à 4°C. La membrane est ensuite incubée dans une solution 0,1% TBST (tampon salin Tris – Tween) contenant 5% de lait en poudre pendant 1 h sous agitation, à température ambiante, ceci afin de bloquer les sites d'interactions non spécifiques. La membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps anti-ubiquitine FK2 (Biomol, Plymouth Meeting, PA) selon une dilution 1 : 5000 dans une solution TBST / 5% lait, à température ambiante. La membrane subit ensuite 4 lavages de 5 min dans un tampon TBST / 5% lait sous agitation à température ambiante. Par la suite, la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps secondaire anti-souris avec une dilution de 1 : 7500, à température ambiante. Ultérieurement, la membrane subit 4 lavages de 5 min dans une solution 5% lait / TBST à température ambiante. Finalement, l'immunobuvardage est visualisé par chimioluminescence (ECL) où la membrane est exposée à un film XAR (Cie univ de rayons X du Canada, Dorval, Québec) et révélée à l'aide d'un développeur Kodak. Cette procédure permet de détecter la lumière émise par le produit de la réaction enzymatique, en présence de peroxyde d'hydrogène, entre le luminol dans la solution de développement et la peroxydase de raifort liée à l'anticorps secondaire. Cette méthode permet de détecter des concentrations aussi faibles que 0,1 femtogramme d'antigène [72].

2.2.9. Analyse par gel coloré à l'argent

D'abord, le gel est incubé dans une solution 5% acide acétique / 50% éthanol pendant 1 h sous agitation à température ambiante. Le gel est ensuite incubé dans une solution aqueuse 50 % éthanol suivi d'une réhydratation à l'aide de 3 lavages de 10 min dans l'eau distillée. Une solution 0,02% Na_2SO_3 est ensuite ajoutée et il y a une incubation d'une minute à température ambiante sous agitation suivi de courts lavages dans l'eau distillée. Par la suite, le gel est incubé dans une solution de 0,1% AgNO_3 pendant 20 min sous agitation à 4°C suivi de courts lavages dans l'eau distillée. Le gel est finalement révélé dans une solution 0,05% formaline / 3% Na_2CO_3 . La coloration est arrêtée en incubant le gel dans une solution 5% acide acétique.

2.2.10. Digestion trypsique de bandes

Les bandes de gel sont d'abord découpées et décolorées avec une solution aqueuse de 15 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ et 50 mM de Na_2SO_3 . Elles sont ensuite lavées par une série de déshydrations / réhydratations dans l'acétonitrile et l'eau. Par la suite, les bandes sont incubées dans une solution 10 mM DTT dans 50 mM NH_4CO_3 à 56°C pendant 30 min. La solution est ensuite remplacée par une autre contenant 55 mM iodoacétamide dans 50 mM NH_4CO_3 , suivi d'une incubation à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 min. Le liquide excédent est aspiré et les bandes sont lavées dans 50 mM NH_4CO_3 . Elles sont ensuite déshydratées dans l'acétonitrile et réhydratées dans une solution de 50 mM NH_4CO_3 contenant 200 ng de trypsine suivi d'une incubation à 37°C pendant la nuit. Une fois la digestion complétée, le surnageant est récupéré et les peptides sont extraits par des lavages dans une solution 90% ACN / 0,5 M urée. Finalement l'échantillon est séché et resuspendu dans le volume approprié.

2.2.11. Fractionnement sur colonne SCX artisanale

Le fractionnement est réalisé sur un système HPLC d'Agilent série 1100. La colonne artisanale SCX (300 μm de diamètre interne sur 10 cm de longueur) est formée

de particules de polysulfoéthyl aspartamide de 300 Å. Cette colonne est reliée à l'injecteur automatique et au détecteur UV à l'aide de capillaires de 50 µm de diamètre interne. L'échantillon trypsique est injecté (40 µL) et l'élution se fait à 10 µL/min à l'aide d'un gradient linéaire de formate d'ammonium de 0 à 25% B en 36 min (A : 5 mM NH₄HCO₂, 15% ACN, pH 3,0 ; B : 2 M NH₄HCO₂, 15% ACN, pH 3,0). Les fractions sont collectées à l'aide d'un collecteur automatique dans des tubes eppendorfs à raison d'une fraction à chaque minute. Les 10 fractions majeures sont ensuite séchées et resuspendues dans 0,2% FA / 5% ACN / H₂O avant l'analyse LC-MS.

2.2.12. Analyse nanoLC-MS/MS

Les séparations chromatographiques sont réalisées sur un système nanoLC d'Eksigent (Eksigent, Dublin, CA) avec une pré-colonne C₁₈ artisanale (5 mm x 300 µm i.d., Jupiter 3 µm, C₁₈) et une colonne analytique artisanale (10 cm x 150 mm i.d., Jupiter 3 µm, C₁₈). Les volumes d'injection varient selon les échantillons et sont injectés sur la pré-colonne à un débit de 4 µL/min. Ils sont ensuite élués vers la colonne analytique à l'aide d'un gradient de 10% à 60% de tampon B (A : 0,2% acide formique / 5% ACN / H₂O, B : 0,2% acide formique / ACN) sur 56 min à un débit de 0,6 µL/min.

Pour les analyses 2D-LC-MS/MS en continu, la colonne SCX (300 Å, 5 µm, Nanoease Waters) est connectée directement à une valve à 10 ports (Valco, Brockville, ON) et est en ligne avec la pré-colonne lors de l'injection de l'échantillon mais en discontinu lors de la séparation des peptides sur la colonne analytique. Les peptides sont élués séquentiellement de la colonne SCX à l'aide de 6 fractions d'acétate d'ammonium à pH 3,0 (0, 50, 100, 150, 300, 1000 et 2000 mM dans 0,2% FA / 2% ACN) où chacune est injectée à partir de l'échantillonneur automatique à un débit de 10 µL/min pendant 5 min via une pompe auxiliaire. Les peptides sont ensuite élués de la colonne analytique tel que décrit précédemment.

L'interface de chromatographie est couplée à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) via une source d'ionisation par

nébulisation nano-électrostatique dont le voltage est maintenu à 1600 V. Le mode d'acquisition est données-dépendantes et chaque «survey scan» de l'Orbitrap (résolution 60 000) est suivi de 3 balayage MS/MS dans la trappe ionique linéaire LTQ. Les ions multiplement chargés avec une valeur d'intensité au dessus de 10 000 comptes (counts) sont sélectionnés pour un séquençage MS/MS. L'énergie de collision normalisée est fixée à 25%. La calibration de masse utilise une calibration interne ((Si(CH₃)₂O)₆, m/z 445,12057).

2.2.13. Recherche des résultats de MS en tandem et corrélation avec une base de données

Subséquentement, tous les spectres sont traités par les logiciels Mascot Distiller (version 2.1.1.0, Matrix Science) et Mascot (version 2.1, Matrix Science, London, UK). Les recherches sont réalisées dans les bases de données non-redondantes IPI_Human_fr (133 842 entrées) et IPI_Mouse_fr (52 326 entrées) (version 3.24). Ces bases de données contiennent l'ensemble des peptides provenant des protéines contenus dans le génome de l'espèce spécifié. La tolérance sur les masses d'ions fragments et précurseurs est fixée à +/- 0,05 et 0,5 Da respectivement. Ces recherches dans les bases de données combinant les versions normales et inverses permettent d'établir la limite sur les scores pour un taux de faux positif de moins de 1%. Un minimum de 2 peptides identifiés par MS/MS est nécessaire pour l'identification de protéines.

2.2.14. Détection des peptides et création des cartes peptidiques à l'aide du logiciel MassSense

Les peptides sont d'abord détectés par MassSense qui génère un fichier .csv contenant les paramètres des peptides (m/z, charge, temps de rétention, intensité, score) à partir des données brutes du spectromètre de masse. Ce fichier est ensuite utilisé pour créer les cartes peptidiques. Les valeurs d'intensité typiquement au-delà de 12 000 comptes sont considérées. Les ions peptidiques sont regroupés à travers les fractions SCX et les répliquats à l'aide de l'algorithme hiérarchique de regroupement similaire du

logiciel MassSense [71]. À partir des résultats de recherche Mascot, le logiciel de regroupement similaire corrèle chaque entrée Mascot à un pic des données MS. Cette corrélation entre les MS et les MS/MS est basée sur la similarité entre la valeur m/z et le temps de rétention suivant une normalisation ($\pm 0,035$ m/z et ± 1 min). Les peptides de différents échantillons ou fractions SCX ayant des m/z et temps de rétention similaires et des identifications Mascot identiques sont regroupés ensemble pour former des groupes de peptides. À partir de la valeur moyenne de m/z du groupe de peptides et la valeur corrigée du temps de rétention, les peptides provenant d'échantillons où aucun MS/MS ou résultat Mascot n'a été obtenu peuvent être ajoutés. Ces peptides peuvent être ajoutés avec un niveau de confiance en comparant la liste de référence des ions voisins de chaque peptide avec la liste des ions voisins dans une zone déterminée (± 5 m/z et ± 4 min). Un minimum de 3 voisins communs doit être détecté pour que le peptide soit ajouté au groupe de peptides. Cette liste de groupe de peptides permet des comparaisons d'abondance entre les échantillons de différentes conditions pour identifier les ions reproductiblement détectés et avec des changements d'intensité significatifs.

3. Méthodes de purification à une étape

3.1. Introduction

La spectrométrie de masse est de plus en plus l'outil de choix pour l'analyse d'échantillons complexes de protéines. Les récents progrès de cette technique permettent maintenant d'identifier des modifications post-traductionnelles telle que l'ubiquitination [55]. En effet, une analyse par spectrométrie de masse permet d'identifier le site d'ubiquitination grâce à un adduit diglycine demeurant sur la lysine modifiée suite à la digestion trypsique. La présence de cette modification est alors évaluée lors de la recherche dans les bases de données à l'aide de l'algorithme de recherche Mascot.

Afin de mieux comprendre le processus d'ubiquitination associé à la dégradation par le protéasome, il est d'abord essentiel d'avoir une méthode permettant de purifier et d'enrichir efficacement les protéines ubiquitinées avant l'analyse par spectrométrie de masse [73]. Ainsi, différentes approches de purification en conditions natives ou dénaturantes ont été utilisées pour isoler les protéines ubiquitinées [29]. L'utilisation d'une forme modifiée d'ubiquitine a été largement appliquée dans la littérature quel que soit l'épitope choisit [32, 74, 75]. À ce jour, les études effectuées chez les mammifères à partir d'une forme 6xHis-ubiquitine se sont révélées beaucoup moins efficaces au niveau du nombre d'identifications : 21, 121 et 244 protéines ubiquitinées comparativement aux études chez la levure : 1075 protéines ubiquitinées [9, 35, 76, 77]. Le désavantage principal de cette approche réside dans la nécessité de modifier génétiquement le modèle étudié afin qu'il exprime la forme modifiée de l'ubiquitine. Cette purification peut par contre être réalisée en conditions natives ou dénaturantes ce qui permet d'identifier les protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées [39].

En effet, l'utilisation d'une méthode de purification en conditions natives conduit à l'identification de protéines ubiquitinées mais aussi des protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées. Ces interactions peuvent être réduites par l'utilisation de tampons de lavage à forte stringence [78]. L'avantage principal d'une purification basée sur l'utilisation d'une protéine ayant un domaine liant l'ubiquitine réside dans sa

versatilité [37]. Ainsi, puisqu'aucune manipulation génétique n'est nécessaire, une multitude de modèles biologiques et de conditions peuvent être étudiés.

Peu importe la méthode de purification utilisée, la difficulté associée aux études chez les mammifères est d'obtenir suffisamment de protéines pour une purification à grande échelle. Le rythme de croissance des levures permet d'obtenir rapidement une grande quantité de matériel protéique comparativement à la culture de cellules de mammifères où le rendement est moindre.

Dans ce chapitre, deux méthodes de purification en conditions natives seront évaluées. D'abord, une méthode d'enrichissement à l'aide d'une colonne d'affinité formée des protéines Rad23, Dsk2 ou Rpn10 possédant un domaine UBA ou UIM sera évaluée. Plusieurs études ont démontré que ces 3 protéines ont des fonctions de récepteurs au niveau du protéasome en liant les protéines polyubiquitinées [79], [80], [81, 82]. Des extraits de cellules EL4 seront utilisés et l'efficacité de la purification sera d'abord évaluée par immunobuvardage anti-ubiquitine et ensuite par spectrométrie de masse. Cette lignée cellulaire murine de thymocytes croît en suspension ce qui permet d'obtenir un nombre élevé de cellules en peu de temps. De plus, la manipulation de cellules en suspension est mieux adaptée aux études à grande échelle.

Ensuite, une approche utilisant une forme d'ubiquitine modifiée par un motif 6x-histidine suivie d'une purification par chromatographie par affinité sur métal immobilisé (IMAC) sera décrite. Une lignée cellulaire rénale d'embryons humains, les HEK 293, est utilisée pour cette méthode d'enrichissement employant des billes de Ni-NTA. En effet, cette lignée cellulaire permet d'obtenir une bonne efficacité de transfection tout en ayant une croissance rapide [83].

3.2. Résultats et discussion

L'approche générale proposée ici pour les 2 méthodes de purification est la suivante : purifier le lysat cellulaire traité avec un inhibiteur du protéasome sur une

colonne d'affinité composée, soit d'une protéine possédant un domaine UBA, soit de billes Ni-NTA ayant une affinité pour le motif 6xHistidine. Une fois les protéines polyubiquitinées liées sur la colonne d'affinité, des lavages sont effectués afin d'éluer les protéines co-purifiant avec les protéines ubiquitinées. Les protéines sont ensuite désorbées de la colonne par un tampon d'élution, ayant un certain degré de spécificité, suivi d'une digestion trypsique. Cet échantillon trypsique est ensuite fractionné sur une colonne SCX, les fractions sont collectées, séchées et analysées individuellement par nano-LC-MS/MS sur un LTQ Orbitrap (figure 3.1). Une recherche dans les bases de données appropriées à l'aide de Mascot permet ensuite d'identifier les peptides et le site d'ubiquitination s'il y a lieu.

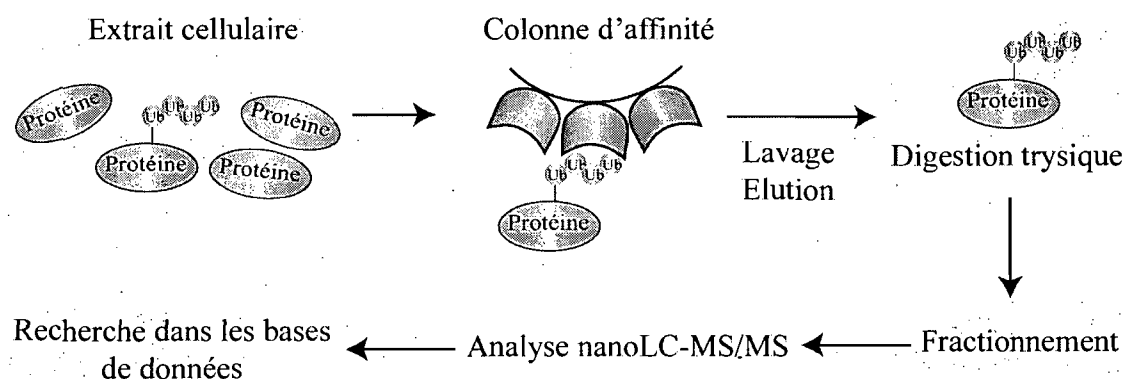


Figure 3.1: Schéma de l'approche de purification proposée.

3.2.1. Optimisation du traitement des cellules

Dans cette étape, nous allons déterminer les paramètres optimaux du traitement des cellules EL4. Il est possible d'inhiber la dégradation des protéines ubiquitinées au sein de la cellule par l'utilisation de différents composés chimiques avant de procéder à la purification des protéines dans un extrait cellulaire. Des études biochimiques ont démontré que les inhibiteurs du protéasome, en particulier le MG132, pouvaient être utilisés pour favoriser l'accumulation dans la cellule de protéines rapidement dégradées par la voie du protéasome sans affecter leur synthèse [84]. Les cellules EL4, en phase exponentielle de croissance, sont traitées ou non avec du MG132 pour différents temps d'incubation. Ensuite, la lyse cellulaire est effectuée en présence ou non de NEM, un

inhibiteur d'isopeptidases [76]. Ainsi, les chaînes de polyubiquitines seront préservées pendant la lyse favorisant ainsi leur adsorption sur la colonne d'affinité.

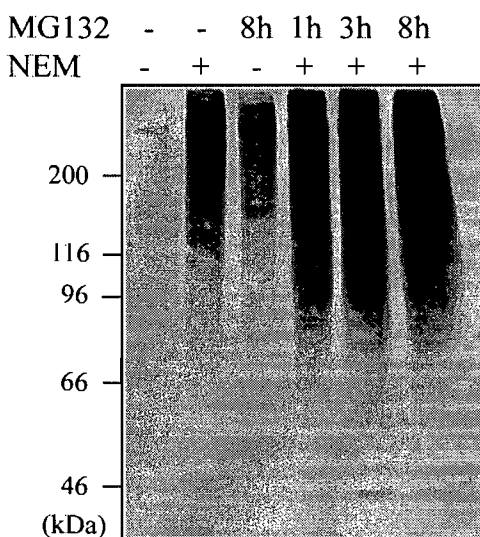


Figure 3.2 : Différents traitements et conditions de lyse des cellules EL4.

Immunobuvardage anti-ubiquitine illustrant l'efficacité du traitement par comparaison de conditions sans MG132 et de conditions avec des temps d'incubation variables avec MG132 suivi d'une lyse avec ou sans NEM.

La traînée visible sur l'immunobuvardage anti-ubiquitine est caractéristique d'un signal de polyubiquitination (figure 3.2). En effet, l'opacité du signal visible sur le film est proportionnelle à la quantité d'antigènes présents sur la membrane de l'immunobuvardage. Ainsi, si des protéines polyubiquitinées sont présentes à plusieurs poids moléculaires différents, un signal intense et continu sera détecté lors d'un immunobuvardage anti-ubiquitine. L'anticorps utilisé dans cette étude reconnaît les formes mono- et polyubiquitinées des protéines sans se lier à la forme libre [85]. Les résultats obtenus démontrent l'efficacité du MG132, largement utilisé dans la littérature, puisque l'intensité du signal augmente en sa présence [38, 39, 77, 84, 86, 87]. Selon le type de cellules utilisées, la concentration optimale et la durée du traitement varient. En effet, Vasilescu *et al.* ont utilisé un traitement de 5 μ M pendant 14 h pour une lignée cellulaire humaine cancéreuse (MCF7) alors que Ventadour *et al.* ont traité leur lignée cellulaire murine de myoblaste avec 50 μ M d'inhibiteur pendant 12 h [27, 38]. Pour des

cellules HEK 293, la concentration couramment utilisée varie entre 20 et 25 μM [39, 88]. Un traitement de 8 h à une concentration de 25 μM et une lyse en présence de NEM ont été sélectionnés comme procédure optimale. Un traitement de 8 h permet l'accumulation d'un grand nombre de protéines polyubiquitinées sans affecter la survie des cellules. Ce choix est basé sur l'intensité du signal d'ubiquitination et le nombre d'espèces ubiquitinées détectées comparativement au contrôle non traité. De plus, l'importance d'utiliser du NEM lors de la lyse cellulaire est confirmée puisqu'en son absence, il y a perte de plus de 50% des protéines ubiquitinées tel qu'indiqué par la diminution de l'intensité du signal d'ubiquitination. Une étude similaire a été effectuée chez les cellules HEK 293 et des résultats concordants ont été obtenus.

3.2.2. Évaluation de 3 protéines possédant un domaine liant l'ubiquitine

Plusieurs études publiées ont démontré que les protéines Rad23, Dsk2 et Rpn10 pouvaient être utilisées pour purifier les protéines ubiquitinées à partir d'un extrait cellulaire [27, 74]. Rad23 et Dsk2 sont des protéines interagissant avec le protéasome et possédant un domaine UBA [13]. Pour sa part, Rpn10 est une sous-unité du protéasome et a été la première protéine découverte démontrant une capacité à lier les chaînes polyubiquitinées dans une expérience *in vitro* [24]. Dans ce travail, les plasmides utilisés pour produire les protéines recombinantes Rad23, Dsk2 et Rpn10 dans les bactéries *E. coli* BL21 permet la fusion avec la protéine GST à l'extrémité N-terminale ce qui rend possible une purification sur billes glutathion. Par la suite, la pureté des protéines produites a été évaluée sur gel SDS-PAGE (figure 3.3). La bande majoritaire de chacune des préparations de protéines correspond au poids moléculaire attendu. Les autres bandes représentent des produits de dégradation de la protéine ou de traduction incomplète.

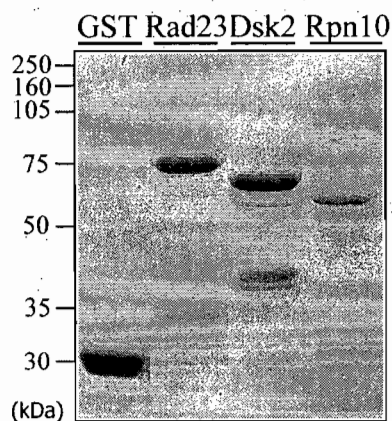


Figure 3.3 : Purification des protéines de fusion exprimées dans les bactéries *E. coli* BL21. La pureté des protéines produites est démontrée par une coloration à l'argent, GST seule (23,9 kDa), GST-Rad23 (66,3 kDa), GST-Dsk2 (63,4 kDa) et GST-Rpn10 (53,6 kDa).

L'affinité de liaison pour les protéines polyubiquitinées a ensuite été évaluée en incubant un lysat cellulaire traité au MG132 et lysé en présence de NEM avec chacune de ces 3 protéines selon un ratio 1 : 50 (figure 3.4).

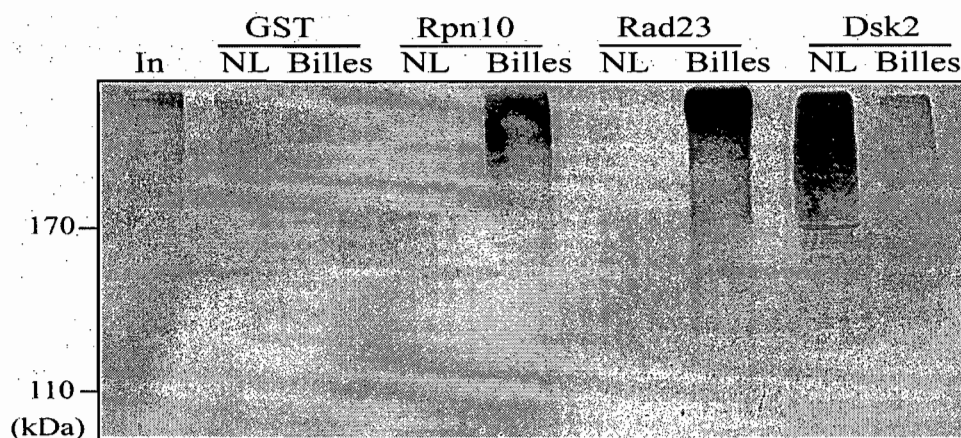


Figure 3.4 : Purification des protéines ubiquitinées à l'aide de 3 colonnes d'affinité différentes. L'efficacité d'enrichissement des protéines GST, Rpn10, Rad23 et Dsk2 est illustrée par un immunobuvardage anti-ubiquitine. 10% du lysat cellulaire initial (In), la fraction non liée (NL) et la fraction liée (Billes) ont été déposés sur gel.

La protéine GST seule est utilisée comme contrôle négatif puisque les 3 protéines utilisées ont été produites sous forme de protéines de fusion GST. Tel qu'attendu, il n'y a aucun signal ubiquitine détecté lorsque le lysat est incubé seulement avec la protéine GST. Ceci confirme que l'enrichissement ne provient pas de cette protéine ou n'est pas causé par des liaisons non spécifiques des protéines ubiquitinées sur les billes lors de la purification. Ce contrôle négatif est celui normalement utilisé pour de telles expériences de purification [41]. Selon les signaux obtenus, Dsk2 possède un très faible pouvoir de liaison des protéines polyubiquitinées puisque la majorité du signal ubiquitine est observé dans la fraction non liée par la colonne. Ce résultat ne concorde pas avec la littérature puisque le groupe de R. Deshaies a utilisé une colonne mixte formée de Rad23 et Dsk2 sans toutefois démontrer le pouvoir de liaison de ces 2 protéines individuellement pour enrichir un échantillon en protéines ubiquitinées [28, 74]. Rad23 et Rpn10 possèdent toutes deux une grande efficacité à lier les protéines polyubiquitinées puisqu'aucun signal ubiquitine n'est détecté dans la fraction non liée. Rad23 a été sélectionné pour la suite du projet puisqu'il possède un bon pouvoir d'enrichissement et son rendement de production en bactéries est supérieur à celui obtenu pour Rpn10.

3.2.3. Optimisation de la méthode d'enrichissement avec Rad23

Plusieurs essais à petite échelle ont été réalisés afin de confirmer l'efficacité d'enrichissement et d'optimiser les différents paramètres de la méthode. Le ratio des billes de Rad23 pour une quantité donnée de lysat de départ, la composition du tampon de lavage et la nature du tampon d'élution ont été évalués.

D'abord, le ratio optimal entre la quantité de lysat et de Rad23 est déterminé dans l'optique d'une purification à grande échelle. Un compromis doit être fait entre une bonne efficacité de purification et une quantité de Rad23 réaliste considérant la production en bactéries de cette protéine.

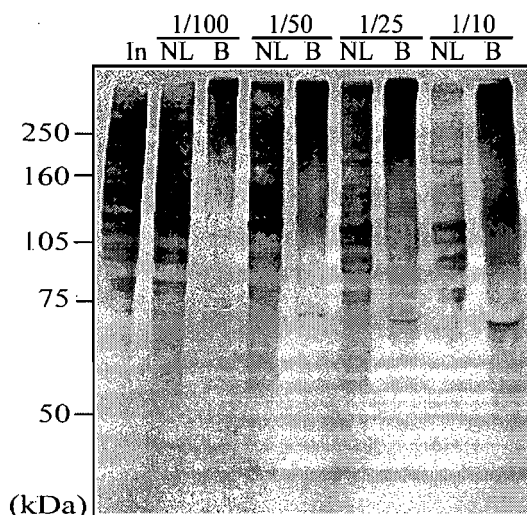


Figure 3.5 : Optimisation du ratio de la quantité de Rad23 pour une quantité fixe de lysat cellulaire. Immunobuvardage anti-ubiquitine de 10% du lysat initial (In), 10% de la fraction non liée (NL) et la totalité de la fraction liée (B) pour chacun des ratios entre les quantités de Rad23 et de lysat.

Selon les résultats obtenus, les purifications subséquentes ont été faites avec un ratio 1/50 (figure 3.5). Le ratio 1/10 démontre la plus grande efficacité à lier les protéines polyubiquitinées puisque le signal ubiquitine est très peu intense dans la fraction non liée comparativement au signal intense présent dans la fraction liée. Par contre, il n'est pas optimal pour des purifications à grande échelle puisque ces essais nécessiteraient une trop grande quantité de cette protéine produite en bactérie. De plus, Raasi *et al.* ont démontré que le domaine UBA de Rad23 lie spécifiquement les chaînes d'ubiquitine liées par la K48 [21]. Ainsi, une certaine proportion des protéines ubiquitinées ne sera jamais retenue par Rad23, ce qui explique la présence d'un signal d'ubiquitination persistant dans la fraction non liée même pour un ratio de 1/10. Ventadour *et al.* ont observé une spécificité de liaison similaire pour S5a, la protéine homologue humaine de Rpn10. En effet, ils ont incubé la fraction non liée de leur colonne d'affinité avec une nouvelle colonne et des protéines ubiquitinées étaient toujours présentes dans la fraction non liée [27]. Ces résultats démontrent bien une spécificité des protéines liant l'ubiquitine pour certains types de chaînes d'ubiquitine.

Afin d'éliminer la majeure partie des protéines fortement abondantes interagissant avec la résine de la colonne et des protéines co-purifiant avec les protéines polyubiquitinées, des tampons de lavage ayant une concentration croissante en sel ont été évalués. Cette stratégie permet de briser les interactions protéines-protéines plus faibles tout en conservant la liaison entre le domaine UBA de Rad23 et les molécules d'ubiquitine liées aux protéines d'intérêt. En effet, la concentration en sel d'un tampon module la force des interactions protéines-protéines ou protéines-résine selon différents mécanismes [89]. Dans la littérature, un tampon de lavage contenant jusqu'à 2 M de chlorure de sodium (NaCl) est utilisé [28]. Dans la présente étude, des tampons de lavage contenant 200 mM, 500 mM, 1 M et 2 M NaCl ont été testés afin d'évaluer s'il y a perte de protéines polyubiquitinées en fonction de la concentration de sel (figure 3.6).

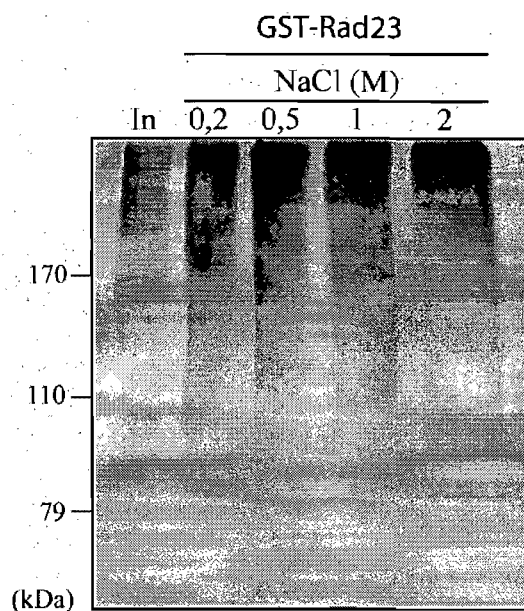


Figure 3.6 : Optimisation des conditions de lavage de la colonne d'affinité Rad23. Immunobuvardage anti-ubiquitine des protéines ubiquitinées liées par GST-Rad23 suite à des lavages contenant différentes concentrations de NaCl.

Selon l'immunobuvardage obtenu, il n'y a pas de perte significative de protéines polyubiquitinées lors des lavages. En effet, même en présence de fortes concentrations de sel, l'intensité des signaux de protéines ubiquitinées ne varie pas entre les différentes conditions.

L'étape suivante consiste à éluer les protéines ubiquitinées de la colonne d'affinité avec efficacité. Trois tampons ont été évalués : une solution 0,3% SDS, 2 M urée et 0,1 M glycine pH 2,5.

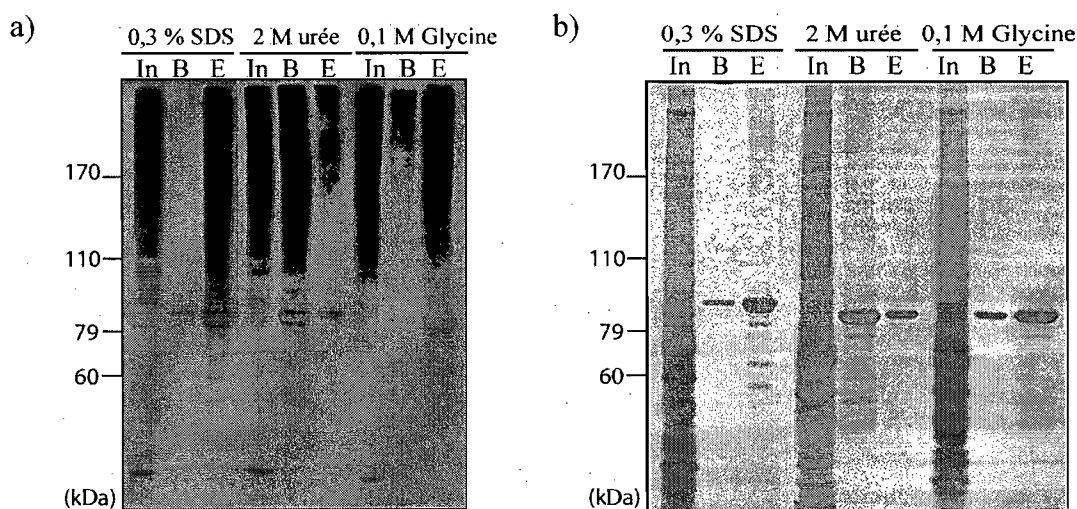


Figure 3.7 : Optimisation des conditions d'élution des protéines liées sur la colonne d'affinité Rad23. L'efficacité d'élution des 3 tampons étudiés soit 0,3% SDS, 2 M urée et 0,1 M glycine pH 2,5 est démontrée par un immunobuvardage anti-ubiquitine (a) et une coloration à l'argent (b). 10% du lysat initial (In), les billes de la colonne (B) après l'élution ainsi que 10% de l'éluat (E) sont déposés sur le gel.

Selon les résultats illustrés par l'immunobuvardage anti-ubiquitine, une solution 0,3% SDS se révèle être la plus efficace pour éluer les protéines ubiquitinées de la colonne d'affinité Rad23 puisqu'il n'y a aucun signal ubiquitine demeurant sur les billes après l'élution (figure 3.7 a). Par contre, il est à craindre que malgré un changement de tampon, une faible quantité de SDS subsiste et ne vienne créer de l'interférence au niveau de la chromatographie. En effet, le SDS est un détergent anionique possédant une longue chaîne d'hydrocarbure, il va donc se lier sur la colonne de C₁₈ et occuper les sites de liaison. Le tampon 2 M urée possède une faible efficacité puisque la majeure partie des protéines ubiquitinées demeurent sur les billes après l'élution et environ

seulement 20% des protéines d'intérêt sont éluées. Finalement, le tampon 0,1 M glycine pH 2,5 se révèle être le plus avantageux puisqu'il permet d'éluer la majorité des protéines polyubiquitinées des billes Rad23 et est compatible avec une digestion trypsique en solution. Lorsqu'un gel est utilisé l'élution peut être faite avec un tampon plus dénaturant, par exemple 8 M urée ou 0,3% SDS, puisque l'éluat est déposé sur gel et ce sont les bandes qui sont digérées à la trypsine [41]. Enfin, le gel coloré à l'argent, pour les 3 conditions d'élution, révèle une bande d'intensité variable à ~70 kDa (figure 3.7 b). Cette bande correspond au poids moléculaire de GST-Rad23. Ainsi, l'interaction avec les billes de glutathion ne résiste pas aux différents tampons d'élution.

Afin d'éviter la présence contaminante de Rad23 pouvant masquer des protéines de plus faible abondance dans les échantillons lors d'analyse au spectromètre de masse, Rad23 a été couplé de façon covalente sur des billes de type Affi-Gel 15 (Biorad). Ce couplage se fait via les amines libres de la protéine et un groupement *N*-hydroxysuccinimide sur les billes selon la réaction chimique illustrée à la figure 3.8. Puisque ces billes réagissent avec les groupements amines, il faut éviter les tampons en contenant, c'est pourquoi la protéine est dialysée avant le couplage.

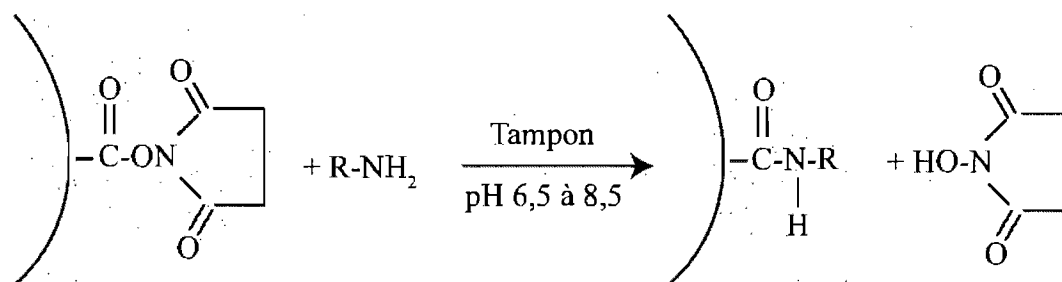


Figure 3.8 : Réaction chimique du couplage sur billes Affi-Gel 15 entre le groupement *N*-hydroxysuccinimide et les amines libres des protéines [90].

Le rendement de couplage est calculé en dosant par essai acide bicinchoninique (BCA) les protéines contenues dans les lavages effectués après le couplage. Un exemple des résultats obtenus est présenté au tableau 3.1. Les rendements de couplage varient généralement entre 40 et 70% selon la concentration de la solution de la protéine à coupler et sa pureté. Cette stratégie de couplage covalent est d'ailleurs utilisée dans

d'autres études utilisant des protéines avec des domaines UBA [28]. Les analyses MS subséquentes d'échantillons préparés avec GST-Rad23 lié sur ce type de billes ont démontré une bonne efficacité de couplage puisque seulement quelques peptides provenant de cette protéine sont détectés.

Tableau 3.1 : Données relatives au couplage covalent de GST-Rad23 sur billes. a) Valeurs obtenues lors du dosage par BCA des solutions du couplage de GST-Rad23 sur billes Affi-Gel 15. b) Données résultant du couplage.

a)	Volume dosé (µL)	Absorbance ¹	Concentration en protéines (µg/µL)
Solution initiale	1	0,465	4,75
Fraction non liée	5	0,413	0,82
Lavage 1	5	0,249	0,42
Lavage 2	10	0,254	0,22
Lavage 3	10	0,181	0,13
Lavage 4	20	0,187	0,07
Lavage 5	20	0,144	0,04

¹ Absorbance corrigée selon le blanc

b)

Quantité de protéines incubées (mg):	3,8
Quantité de protéines dans les surnageants (mg):	1,3
% de protéines couplées aux billes:	66

3.2.4. Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon purifié par Rad23

Une fois toutes les étapes de la purification optimisées, des essais à grande échelle ont été réalisés. D'abord, la quantité de lysat initial nécessaire a été déterminée par des colorations à l'argent des échantillons enrichis par la colonne d'affinité GST-Rad23 ou par GST seule. Lors d'une étude comparable faite chez des cellules de mammifères en culture *in vitro*, 5×10^8 cellules avaient été utilisées ce qui correspond à environ 75 mg de protéines [39]. Les chercheurs avaient identifié plus de 600 protéines ubiquitinées à l'aide d'une purification sur une colonne d'anticorps anti-ubiquitine. Une étude similaire avec le domaine UIM de Rpn10 a été réalisée chez la plante (*Arabidopsis*

Thaliana) où 2 g de protéines avaient été utilisés pour la purification [41]. Dans cette étude, seulement 300 protéines avaient été identifiées. Ainsi, une grande quantité de lysat de départ ne garantit pas nécessairement un grand nombre d'identifications. L'efficacité de la purification, la méthode de fractionnement utilisée et la sensibilité du spectromètre de masse sont aussi des facteurs déterminants pour identifier de nombreuses protéines.

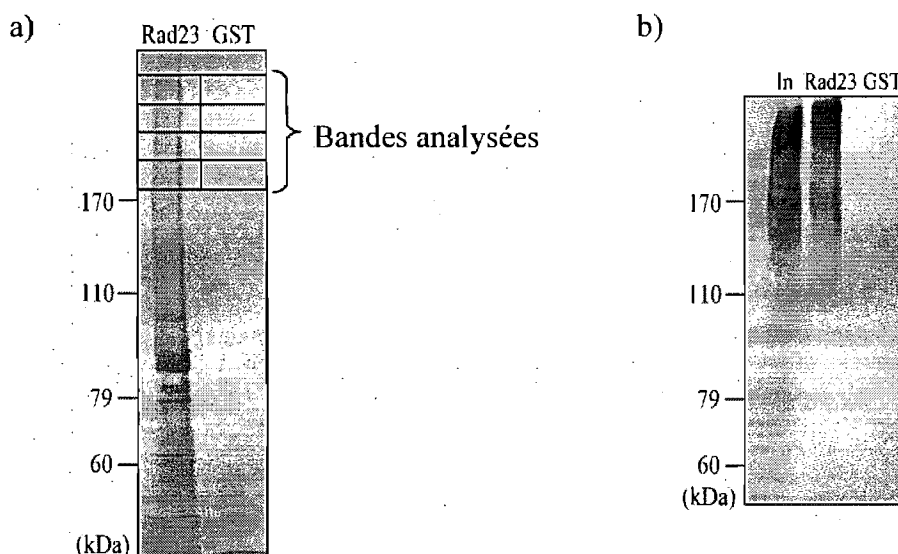


Figure 3.9 : Purification des protéines ubiquitinées à partir d'un lysat de cellules EL4 sur colonne d'affinité Rad23 ou GST. a) Gel coloré à l'argent de l'échantillon enrichi (95%). **b)** Immunobuvardage anti-ubiquitine de l'échantillon enrichi (5%). 10% du lysat initial (In) est aussi déposé sur gel.

Le gel coloré à l'argent de l'échantillon purifié sur une colonne de Rad23 obtenu à partir de 50 mg d'extrait cellulaire illustre très bien la complexité de l'échantillon puisque des protéines sont présentes à tous les poids moléculaires (figure 3.9 a). De plus, la faible intensité des bandes de l'échantillon purifié sur une colonne de billes GST indique l'efficacité des lavages pour réduire la présence de protéines contaminantes provenant de liaisons non spécifiques sur la résine des billes. L'immunobuvardage anti-ubiquitine confirme la présence de protéines ubiquitinées de hauts poids moléculaires dans l'échantillon enrichi sur une colonne de GST-Rad23 ainsi que l'absence de ces protéines dans le contrôle négatif soit la colonne GST (figure 3.9 b). Ainsi, les protéines

de plus faibles poids moléculaires visibles sur le gel colorés à l'argent ne sont pas des protéines ubiquitinées puisqu'il n'y a aucun signal ubiquitine présent à ces poids moléculaires sur l'immunobuvardage.

Diverses analyses préliminaires au spectromètre de masse ont permis de déterminer le niveau de complexité de l'échantillon purifié. D'abord, 4 bandes en haut du gel présenté à la figure 3.9 a) ont été découpées et une digestion trypsique des protéines a été réalisée. Ensuite, les peptides obtenus ont été analysés sur le Q-TOF Premier (Waters). Les peptides présents dans l'échantillon GST ou communs ne sont pas considérés car ce sont, pour la majorité, des peptides provenant de protéines contaminantes. Ainsi, les peptides uniquement identifiés dans l'échantillon enrichi par Rad23 correspondent à 139 protéines potentiellement ubiquitinées. Lorsqu'un échantillon similaire préparé à partir de 50 mg de lysat cellulaire est digéré en solution par la trypsine et analysé par 2D-LC-MS/MS en continu sur le LTQ-Orbitrap, seulement 47 protéines uniques sont identifiées seulement dans l'échantillon purifié par GST-Rad23. Le fractionnement apporté par la colonne SCX placée en ligne avec la colonne analytique de C₁₈ est plus faible que celui d'une séparation sur gel, par contre, il y a possiblement eu une erreur lors du dosage des protéines contenues dans l'échantillon enrichi puisque très peu de protéines ont été identifiées. En effet, une telle analyse devrait permettre d'identifier une centaine de protéines. Toutefois, afin d'avoir le meilleur fractionnement possible, un échantillon purifié à partir de 50 mg de lysat cellulaire est d'abord séparé sur une colonne capillaire SCX artisanale en mode discontinu et ensuite analysé par LC-MS (section 2.2.11). Les caractéristiques analytiques de ce type de colonne ont été publiées dans un mémoire de maîtrise [91]. Le fractionnement sur cette colonne en mode discontinu a permis d'augmenter le nombre de protéines uniques identifiées à 447. Ces résultats sont résumés à la figure 3.10.

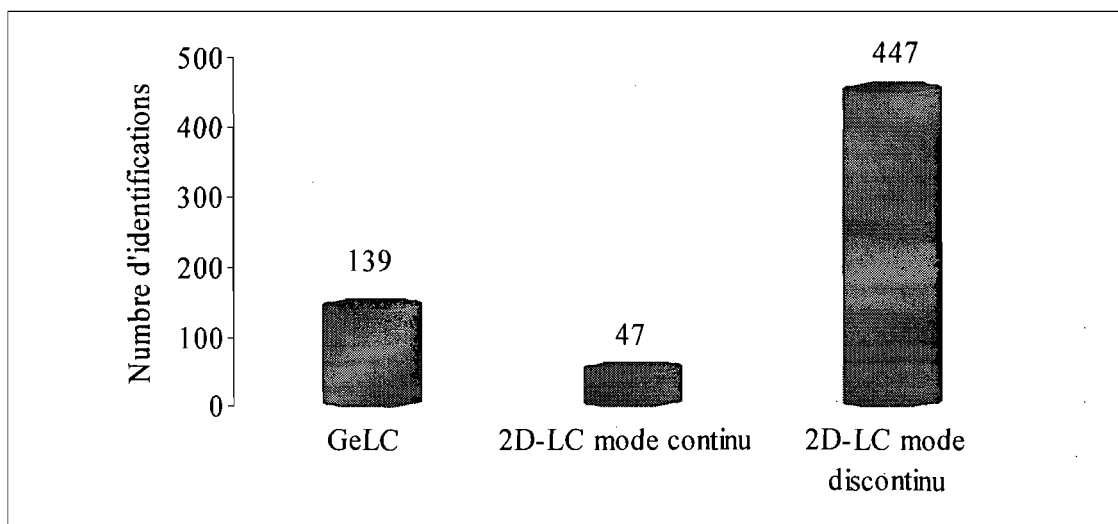


Figure 3.10 : Comparaison du nombre de protéines identifiées selon la méthode de séparation utilisée avant l'analyse au spectromètre de masse.

Ces essais confirment la nécessité de fractionner suffisamment l'échantillon afin de réduire sa complexité avant l'analyse par LC-MS/MS et ainsi augmenter le nombre d'identifications. Lorsque le fractionnement n'est pas suffisant, seules les protéines fortement abondantes telles l'actine et l'ubiquitine sont identifiées. Pour l'approche sur gel, 4 bandes couvrant les masses de 200 à 170 kDa ont été analysées permettant d'identifier 139 protéines, par simple corrélation linéaire, il y aurait en moyenne 35 protéines par bande. Pour le fractionnement sur colonne capillaire SCX en mode discontinu, 10 fractions ont été collectées. Par estimation, il y aurait donc en moyenne 45 protéines identifiées par fraction. Ces 2 méthodes de fractionnement permettent donc une séparation du même ordre de grandeur alors que celle par 2D-LC en mode continu n'est pas suffisante pour la complexité de l'échantillon obtenu. En fait, l'électrophorèse sur gel est basée sur la différence de mobilité des protéines chargées. Cette mobilité dépend de la charge, de la taille et de la structure tertiaire de la protéine [42]. Par contre, l'électrophorèse sur gel n'est pas la méthode adéquate pour séparer des protéines ubiquitinées à cause de l'hétérogénéité des chaînes de polyubiquitines [39]. Cette approche n'a donc pas été retenue malgré un excellent pouvoir de séparation des protéines. La séparation sur colonne SCX est basée elle aussi sur la charge mais au niveau des peptides, la taille de la protéine initiale n'a donc aucun impact. Le

fractionnement des peptides en mode discontinu a été choisi puisqu'il permet d'identifier un grand nombre de protéines.

Ensuite, la reproductibilité de cette séparation sur colonne SCX artisanale a été évaluée. Des aliquots d'environ $\sim 20 \mu\text{g}$ de protéines d'un échantillon enrichi par l'approche sur billes de Ni-NTA ont été injectés en triplicata. Chaque fraction, pour un total de 10, est ensuite collectée, séchée et injectée par LC-MS/MS sur le LTQ-Orbitrap. La distribution des intensités des ions peptidiques reproductiblement détectés dans les 3 réplicats comparée à la valeur moyenne est représentée à la figure 3.11 a). Tous les ions multiplement chargés sont étroitement distribués le long d'une droite imaginaire à 45° indiquant une bonne reproductibilité. La majorité des peptides, 88%, se situe à l'intérieur d'une variation d'intensité de 2 fois et la médiane de l'écart type relatif est de 32%. Cette dernière valeur est similaire à celle obtenue lors du développement de ce type de colonne SCX artisanale [91]. Ces résultats démontrent une bonne reproductibilité de la colonne SCX pour un fractionnement des peptides avant l'analyse par LC-MS/MS.

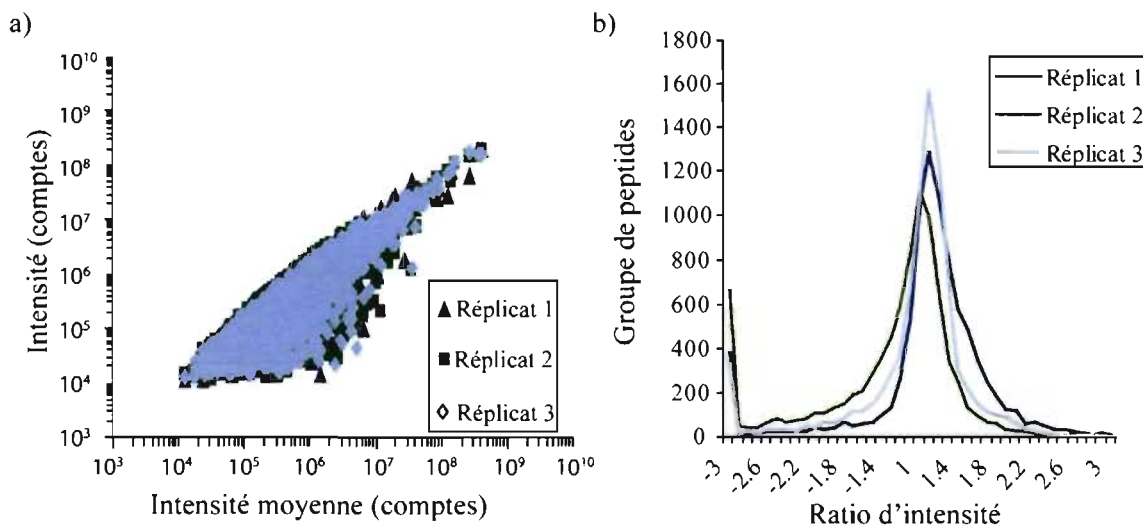


Figure 3.11 : Reproductibilité de la séparation des peptides d'un extrait enrichi en protéines ubiquitinées sur une colonne capillaire SCX.
 a) Distribution de l'intensité des ions multiplement chargés détectés de façon reproductible à travers des triplicatas. b) Graphique du ratio entre l'intensité du réplicat et l'intensité moyenne pour chaque groupe de peptides.

Deux extraits cellulaires de 50 mg de EL4 ont ensuite été incubés sur une colonne de Rad23 ou de GST, digérés en solution avec la trypsine, fractionnés sur une colonne capillaire SCX artisanale et chacune des fractions a été injectée par nanoLC-MS/MS sur un LTQ-Orbitrap tel que schématisé à la figure 3.1. Par la suite, tous les spectres MS/MS ont été traités par Mascot Distiller et une recherche limitée aux peptides tryptiques a été réalisée dans la base de données IPI_Mouse_fr à l'aide de Mascot selon les paramètres de recherche décrits au chapitre 2. Le calcul du taux de faux positifs est fait à l'aide de l'approche des bases de données concaténées normale et inverse pour différents scores limites [69]. La limite sur les scores des identifications de Mascot a été fixée à 35 pour avoir un taux de faux positifs inférieur à 1% pour les 2 échantillons. Les cartes peptidiques de toutes les analyses ont été générées à l'aide du logiciel MassSense [71]. Les cartes peptidiques illustrent bien la différence de population entre l'échantillon contrôle et celui enrichi en protéines ubiquitinées, ce qui corrèle avec les gels colorés à l'argent obtenus (figure 3.12).

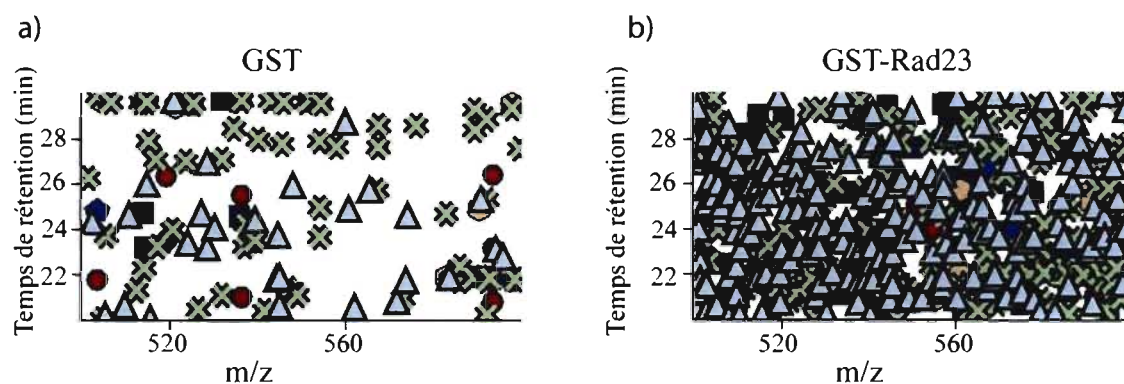


Figure 3.12 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon enrichi par la colonne GST (a) et de celui enrichi par la colonne GST-Rad23 (b).

Ensuite, par un processus de regroupement similaire, le logiciel MassSense aligne les peptides ayant été séquencés par Mascot avec les pics des spectres MS. Ainsi, pour chaque peptide identifié, il est possible d'obtenir une corrélation avec sa valeur m/z , son temps de rétention et son intensité. Une comparaison d'abondance entre deux échantillons est donc possible. Seuls les peptides détectés uniquement dans l'échantillon

enrichi par Rad23 ont été considérés comme étant ubiquitinés. Ceci afin d'éliminer les protéines contaminantes provenant de liaisons non spécifiques sur la résine [9].

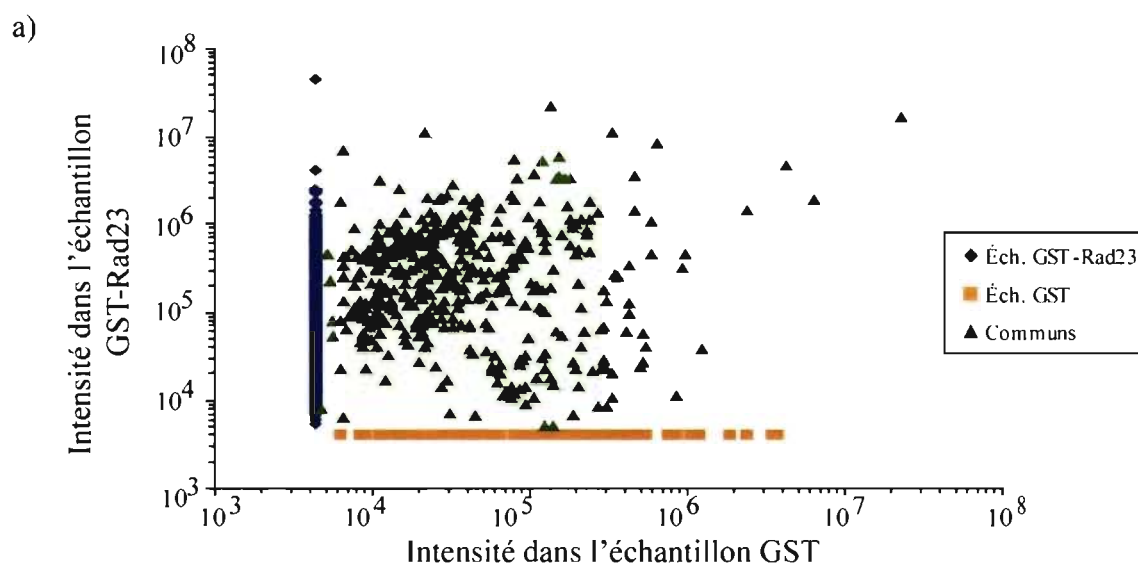


Figure 3.13 : Regroupement similaire de l'intensité des peptides à travers les échantillons. a) Distribution d'intensités des peptides identifiés dans les échantillons purifiés par GST et GST-Rad23.

Tableau 3.2 : Tableau représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.

b)	Groupes de peptides	%
Échantillon GST-Rad23	744	56,5
Échantillon GST	140	10,6
Communs	432	32,8
Total	1316	

Ces traitements de données permettent de tracer une distribution d'intensités dans chaque échantillon de tous les groupes de peptides identifiés (figure 3.13 et tableau 3.2). Sur cette représentation, les peptides identifiés uniquement dans un échantillon sont disposés sur les droites verticale ou horizontale. Les peptides en commun entre les 2 échantillons sont dispersés au centre du graphique selon leur intensité dans les échantillons. Ces analyses ont mené à l'identification de 744 groupes de peptides

uniques dans l'échantillon GST-Rad23 (56,5%), 140 groupes de peptides dans l'échantillon GST (10,6%) et à 432 groupes de peptides communs entre les deux échantillons (32,8%). Ces peptides correspondent à 447 protéines distinctes identifiées uniquement dans l'échantillon GST-Rad23 (73,8%), 51 distinctes pour l'échantillon GST (8,4%) et 108 protéines communes (17,8%). Les protéines ayant été identifiées par un seul peptide ont été rejetées. La majorité des protéines en commun sont des protéines fortement abondantes dans la cellule, par exemple des protéines structurales telles la tubuline et l'actine ou des protéines ribosomales. Il y a aussi des protéines contaminantes retrouvées dans la majorité des purifications par affinité telles l'ATP synthase, la nucléophosmine et des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes [92]. Il est à noter que la majorité des protéines communes aux 2 échantillons sont tout de même plus intenses dans l'échantillon enrichi par Rad23. Ainsi, ces protéines pourraient être réellement ubiquitinées, une confirmation par une approche complémentaire serait nécessaire, par exemple par immunoprécipitation de la protéine désirée suivi d'une détection par immunobuvardage [48]. En ce qui concerne les protéines uniques à l'échantillon GST, ce sont pour la plupart des isoformes ou sous-unités légèrement différentes des protéines communes aux 2 échantillons. Par exemple, la chaîne β -6 de la tubuline a été identifiée seulement dans l'échantillon incubé avec la GST alors que les chaînes β -2C, β -3 et β -5 de la tubuline ont été séquencées dans les 2 échantillons. Cette difficulté dans l'interprétation des données provient du fait que l'analyse est centrée sur la nature du peptide. La même séquence peptidique peut appartenir à différentes protéines ou isoformes d'où une certaine ambiguïté lors de l'identification de la protéine [67].

Un diagramme circulaire selon différentes classes fonctionnelles a été tracé avec les 447 protéines ubiquitinées identifiées uniquement dans l'échantillon enrichi par Rad23 (figure 3.14). Ce diagramme permet une analyse générale du système de dégradation du protéasome. Tel qu'identifié chez la levure, la majorité des protéines dégradées par le protéasome est impliquée dans le métabolisme de la cellule (49%) [28]. Cette catégorie regroupe tous les systèmes par lesquels la cellule transforme des substances chimiques ainsi, tous les enzymes sont inclus dans cette catégorie.

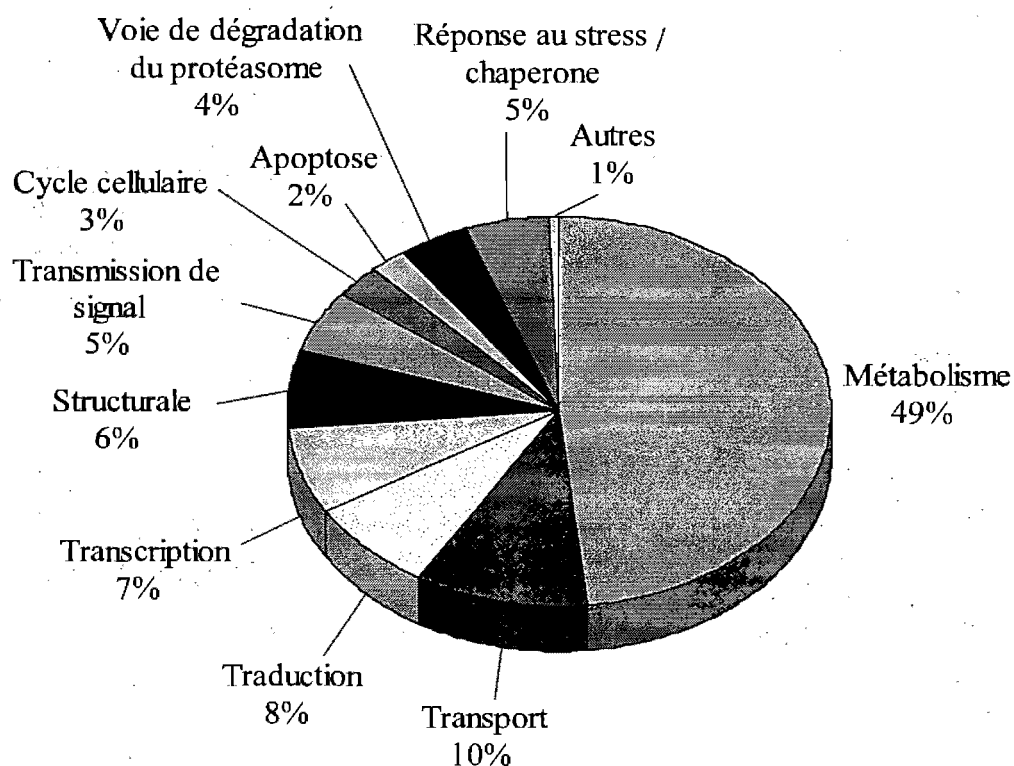


Figure 3.14: Distribution des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes catégories fonctionnelles.

La deuxième classe en importance est celle des protéines impliquées dans le transport. Une étude récente chez la levure a aussi identifié cette classe comme étant une catégorie de protéines fortement ubiquitinées [33]. Toutes les protéines impliquées au niveau du transport des macromolécules, des petites molécules ou des ions sont incluses dans cette classe. Par exemple, l'ADP/ATP translocase 1 a été identifiée et est assignée à cette classe.

La classe de la traduction (8%) comprend une grande proportion de protéines ribosomales. Une étude précédente avait identifié plusieurs de ces protéines, même sous des conditions dénaturantes, ainsi que plusieurs sites d'ubiquitination suggérant une relation multifonctionnelle entre les protéines ribosomales et l'ubiquitination [39]. En effet, sachant que les ribosomes sont des complexes synthétisés de manière fortement

organisés, des formes immatures ou ayant des défauts sont fréquentes et donc couramment une cible pour la dégradation par le protéasome [23].

Quelques protéines impliquées dans le processus d'ubiquitination ont été identifiées, notamment l'ubiquitine et son précurseur ainsi que de nombreuses sous-unités du protéasome, dont un isoforme de Rpn10. Il est connu que les sous-unités du protéasome interagissent avec de nombreuses protéines régulatrices ou connues pour être ubiquitinées [38]. De plus, une enzyme similaire à l'enzyme E1A, une enzyme E3, l'isoforme 2 d'une protéine contenant plusieurs domaines d'interaction avec l'ubiquitine, ainsi qu'une enzyme de déubiquitination, l'ubiquitine hydrolase carboxy-terminale 14 (USP14), ont été identifiées. Sachant que les enzymes E1, E2 et les E3 de type HECT sont liées à l'ubiquitine via un lien thioester, il est possible que ces protéines co-purifient avec les protéines polyubiquitinées. De plus, il a été suggéré que l'activité de USP14 est régulée par le niveau de substrats polyubiquitinés, ainsi une accumulation causée par l'inhibition du protéasome conduirait à une augmentation de son activité [93]. Ceci pourrait expliquer sa présence dans l'échantillon enrichi. Cette catégorie inclut aussi la protéine riche en proline BAT3. Cette dernière possède un domaine semblable à l'ubiquitine (UBL) près de son extrémité N-terminale et a été identifiée dans une étude précédente chez des cellules humaines comme étant ubiquitinée [77].

Il est aussi attendu que plusieurs protéines impliquées dans la réponse au choc thermique ou au stress soient identifiées puisqu'il y a une augmentation de la synthèse de ce type de protéines lors d'un traitement avec un inhibiteur chimique du protéasome tel le MG132 [26]. Par exemple, la protéine HSP90 bêta a été identifiée uniquement dans l'échantillon enrichi et l'ubiquitination de cette protéine a été confirmée par immunobuvardage dans une étude précédente chez des cellules humaines [94]. Quelques protéines sont aussi identifiées dans les catégories traduction, transmission de signal, cycle cellulaire et apoptose. Par exemple, 3 protéines de la famille des MCM (minichromosome maintenance), MCM3, MCM4 et MCM6 ont été identifiées. Ces protéines sont des régulateurs importants du cycle cellulaire puisqu'ils sont impliqués au

niveau de l'initiation de la réplication et de l'élongation de l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire [95].

Après avoir mis au point une méthode de purification, il convient d'en déterminer le niveau d'enrichissement dans l'échantillon final. Pour ce faire, différentes façons d'évaluer ce facteur ont été élaborées. Par exemple, pour les phosphopeptides, la purification se fait d'abord au niveau des peptides sur colonne de dioxyde de titane et le site de phosphorylation est habituellement identifié en MS. Ainsi, la proportion de phosphopeptides enrichis est déterminée en faisant le ratio de phosphopeptides identifiés sur le nombre total de peptides [96]. En revanche, puisque la purification présentée ici se fait au niveau des protéines ubiquitinées et que les peptides portant l'adduit diglycine sont difficilement détectés, cette méthode n'est pas appropriée. Par ailleurs, il est possible d'estimer le niveau d'enrichissement en comparant visuellement l'intensité globale des bandes du gel coloré à l'argent d'un échantillon enrichi ou non (présenté à la figure 3.9 a). D'après ce gel, l'enrichissement en protéines ubiquitinées et en protéines associées est évalué à environ 80% puisque très peu de protéines sont présentes dans le contrôle négatif. D'autre part, une approche complémentaire proposée ici consiste à analyser un lysat non enrichi avec la même méthode que l'échantillon enrichi puis à faire le ratio d'intensité du peptide ESTLHLVLR de l'ubiquitine entre les deux échantillons. Ce peptide a été choisi car il est le seul appartenant à l'ubiquitine et détecté dans l'échantillon non enrichi. Il représente alors le seul point de référence entre les deux conditions. En effet, aucun autre peptide de l'ubiquitine ni aucun peptide portant l'adduit diglycine n'est détecté. L'intensité a été normalisée vis à vis de la quantité de protéines présente dans l'échantillon ce qui donne un ratio final de 25. On peut alors estimer que l'ubiquitine est 25 fois plus abondante dans l'échantillon enrichi que dans un échantillon non enrichi. Ceci laisse supposer que les protéines ubiquitinées sont elles aussi 25 fois plus abondantes pourtant le gel coloré à l'argent démontre un meilleur enrichissement (figure 3.9 a).

3.2.5. Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon de protéines purifié par Rad23

Tel que décrit précédemment, il est possible d'identifier les sites d'ubiquitination par spectrométrie de masse. En effet, un adduit diglycine provenant de l'ubiquitine demeure sur la lysine modifiée suite à la digestion trypsique ce qui cause une augmentation de masse de 114,043 Da du peptide. La recherche dans les bases de données s'effectue en considérant la possibilité de cette modification. Parmi toutes les analyses d'échantillons enrichis par Rad23 ayant été faites, 2 peptides avec une modification -GlyGly ont été identifiés, soit la lysine 850 (K850) de la sous-unité 10 du facteur eukaryotique 3 d'initiation de la traduction (EIF-3 θ) et la lysine 195 (K195) de la sous-unité alpha type 4 du protéasome (figure 3.15).

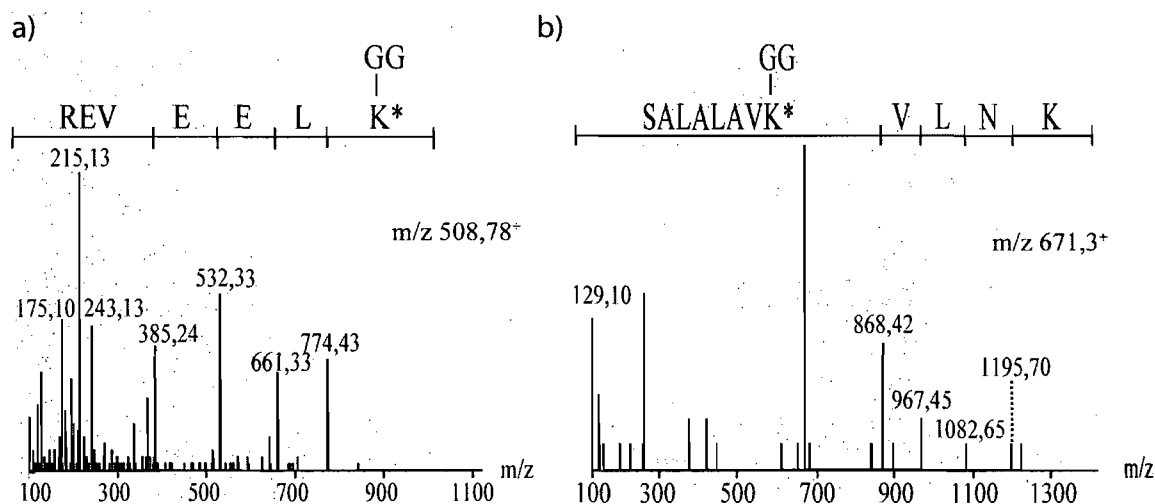


Figure 3.15: Spectres MS/MS des peptides portant l'adduit -GG. a) K850 de eIF-3 θ . b) K195 de la sous-unité alpha type 4 du protéasome.

Chaque site a été validé par une inspection manuelle des spectres MS/MS puisqu'il est possible d'avoir une fausse assignation donnée par Mascot. Tous les peptides modifiés sont trypsiques ce qui exclu la possibilité d'un faux positif causé par la présence des acides aminés Leu (113,2 Da), Ile (113,2 Da) ou Asp (114,1 Da) voisins de la lysine [4]. En effet, ces acides aminés ayant une masse similaire à celle de l'adduit diglycine, il peut y avoir confusion. En plus de l'inspection manuelle, la grande

précision de masse obtenue par l'Orbitrap permet de discriminer de fausses identifications lorsque le spectre MS/MS est de faible qualité.

Une étude parue récemment met en garde contre des artéfacts causés par l'iodoacétamide utilisée lors de l'étape d'alkylation suivant la réduction des ponts disulfure avant la digestion trypsique [97]. Selon ce qui a été observé par ces chercheurs, 2 molécules d'iodoacétamide (57,021 Da) pourraient former un adduit sur un résidu lysine. Cet adduit posséderait donc la même composition atomique qu'un adduit diglycine provenant de l'ubiquitine. Par contre dans cet article, lors de la préparation de l'échantillon, une concentration de 55 mM d'iodoacétamide est utilisée alors que la préparation des échantillons de la présente étude n'utilise que 5 mM. Il a donc été estimé que les probabilités de rencontrer de tels artéfacts sont faibles considérant la faible concentration de réactif utilisé. De plus, si des artéfacts se produisent réellement lors de la préparation de l'échantillon, ils seront aussi présents dans l'échantillon contrôle, ce qui n'est pas le cas ici. En effet, aucun peptide portant le motif diglycine n'est détecté dans les échantillons contrôles. Toutefois, l'étude suggère l'utilisation de chloroacétamide comme agent alkylant de remplacement et ce réactif pourrait facilement être utilisé pour des études futures afin de limiter les confusions possibles.

Enfin, malgré une étude controversée rapportant la possibilité pour la trypsine de cliver au niveau de la lysine modifiée, la majorité des études s'entendent sur le défaut de coupure de la trypsine au site ubiquitiné [50]. Par contre, en présence d'un excès de trypsine, il est possible d'imaginer qu'il y ait tout de même un clivage au niveau d'une lysine ubiquitinée. Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée dans le cadre de ce projet. Cette étude émettait aussi la possibilité d'un défaut de coupure au niveau des résidus de l'ubiquitine, résultant en un adduit de 4 acides aminés sur la lysine modifiée soit -LRGG. Cette modification correspond à une augmentation de masse du peptide de 383,228 Da. Cette dernière a été ajoutée aux paramètres de recherche de Mascot. Par contre, aucun spectre MS/MS de qualité pour un peptide ayant cet adduit n'a été

identifié. De plus, très peu d'études ont présenté des spectres MS/MS de bonne qualité de peptides portant cette modification, une grande attention doit donc être portée [94].

Un des sites identifiés se situe sur la protéine EIF-3. Celle-ci est une protéine impliqué dans la liaison des ARN de transfert et messager à la sous-unité 40S du ribosome [98]. Elle est composée d'une dizaine de sous-unités et semble agir comme adaptateur entre l'appareil d'initiation de la traduction et le cytosquelette dans la cellule. La K850 de la sous-unité 10 a été identifiée comme site d'ubiquitination, cependant, aucune structure tridimensionnelle de cette sous-unité précise ou d'un homologue n'est disponible sur le serveur Protein Data Bank. Il aurait été intéressant de localiser ce résidu dans la structure tertiaire de la protéine. Ce facteur de traduction a été identifié comme protéine ubiquitinée dans une étude à grande échelle similaire chez *Arabidopsis thaliana* et la K61 a été identifiée comme site d'ubiquitination. Dans cette étude les chercheurs ont utilisé une colonne formée du domaine UBA d'une enzyme de déubiquitination ou du domaine UIM de l'homologue chez la plante de Rpn10 [41]. Par contre, il existe une faible homologie de séquence entre cette protéine chez la plante et la souris ce qui pourrait expliquer la différence de site identifié.

Tel que décrit précédemment, le protéasome est formé du complexe catalytique 20S et du complexe régulateur 19S situé aux 2 extrémités du domaine 20S. Chacune de ses sous-unités peut être divisée en sous-familles alpha et bêta [99]. La sous-unité alpha type 4 du protéasome fait partie du complexe 20S. Le site d'ubiquitination identifié sur cette protéine est la K195. La structure tridimensionnelle de cette protéine illustre la position de cette lysine située à l'extérieur de la structure (figure 3.16). Il est connu que les lysines modifiées par l'ubiquitine sont exposées à la surface de la protéine et sont faciles d'accès pour les ligases [100]. De plus, cette étude suggère une préférence pour l'ubiquitination sur des lysines faisant partie d'une hélice ce qui est le cas pour la K195. Ceci vient appuyer l'identification de ce site d'ubiquitination. Une étude en conditions dénaturantes chez des cellules humaines a identifié la K237 de la sous-unité 4 du complexe 20S comme site d'ubiquitination [39]. Elle suggère l'ubiquitination du protéasome causé par son association avec des enzymes d'ubiquitination.

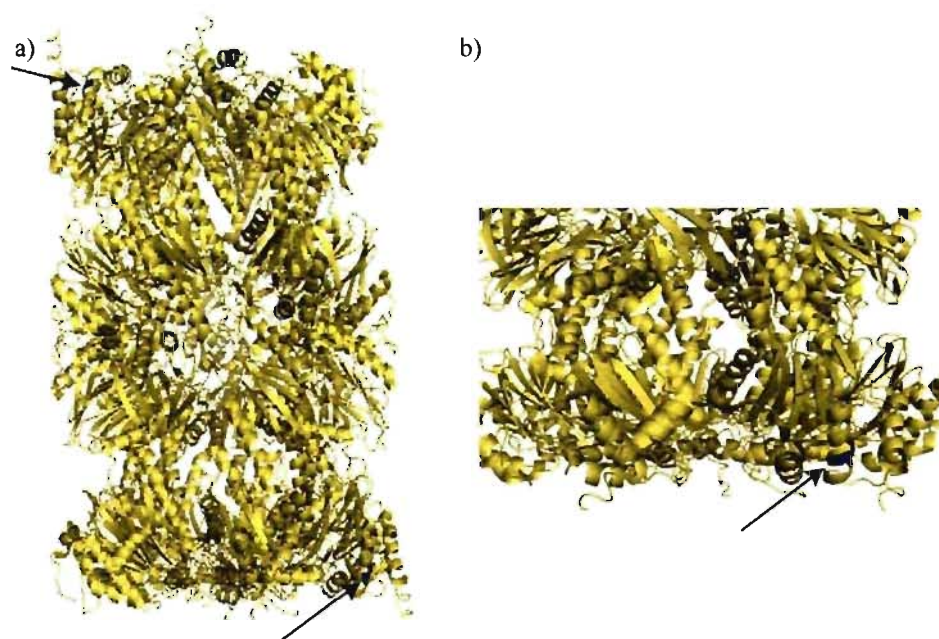


Figure 3.16 : Structure tridimensionnelle du complexe régulateur 20S du protéasome. a) Vue complète de la structure. b) Plan rapprochée de la K195
(Source : Protein Data Bank, code 1iru).

Une approche de purification à l'aide de la protéine Rad23 a été développée avec succès et a permis l'identification de 447 protéines ubiquitinées à partir de 50 mg de lysat cellulaire. Aucune étude similaire n'a été réalisée chez la souris, par contre, une étude impliquant la transfection de la forme 6xHis-ubiquitine avait permis d'identifier 121 protéines [35]. La méthode proposée ici permet donc un plus grand nombre d'identifications sans nécessiter de modification génétique du modèle étudié. L'approche mise au point pourrait apporter d'importantes avancées au niveau de la régulation des structures et fonctions cellulaires par l'identification des protéines dégradées par le protéasome. Par exemple, il serait possible d'étudier le rôle précis d'une enzyme E3 en comparant un modèle biologique où une mutation est induite dans le gène de cette E3 avec le modèle non muté. Ainsi les substrats de cette enzyme vont s'accumuler dans le modèle mutant comparativement au contrôle.

3.2.6. Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon purifié sur billes de Ni-NTA

Afin de comparer les résultats obtenus avec une approche basée sur Rad23, une purification sur colonne de Ni-NTA basée sur l'expression d'une forme 6xHis-ubiquitine a été évaluée. L'utilisation de la transfection pour exprimer cette forme modifiée d'ubiquitine implique qu'il y a une possibilité d'affecter la stœchiométrie normale d'ubiquitination par une surexpression d'ubiquitine. Selon Mayor *et al.*, la forme modifiée de l'ubiquitine est clairement moins active que la forme naturelle de l'ubiquitine [74]. Ainsi, la perturbation du système ubiquitine-protéasome est probablement moins importante lorsque les cellules expriment la forme naturelle ainsi que la forme modifiée de l'ubiquitine, comme c'est le cas dans le modèle étudié ici. En effet, dans les cellules 293T de la présente étude, il y a deux formes d'ubiquitine exprimées : la forme naturelle et celle portant le motif 6xHis. Les cellules sont transfectées avec un plasmide d'ADN codant pour 6xHis-ubiquitine ou un plasmide contrôle et la purification se fait en conditions natives sur colonne de Ni-NTA. Le plasmide contrôle est un plasmide ne contenant pas l'ADNc 6xHis-ubiquitine. Le rendement de transfection est d'environ 75% ce qui correspond au nombre de cellules exprimant les 2 formes d'ubiquitine. Contrairement aux études faites chez la levure par le groupe de Deshaies, la digestion trypsique ne sera pas directement fait sur les billes de Ni-NTA [28, 101]. En effet, il s'agit d'éviter de digérer les protéines liées de façon non spécifiques sur la résine des billes. Une élution spécifique des protéines portant le motif histidine est réalisée à l'aide d'un gradient d'imidazole.

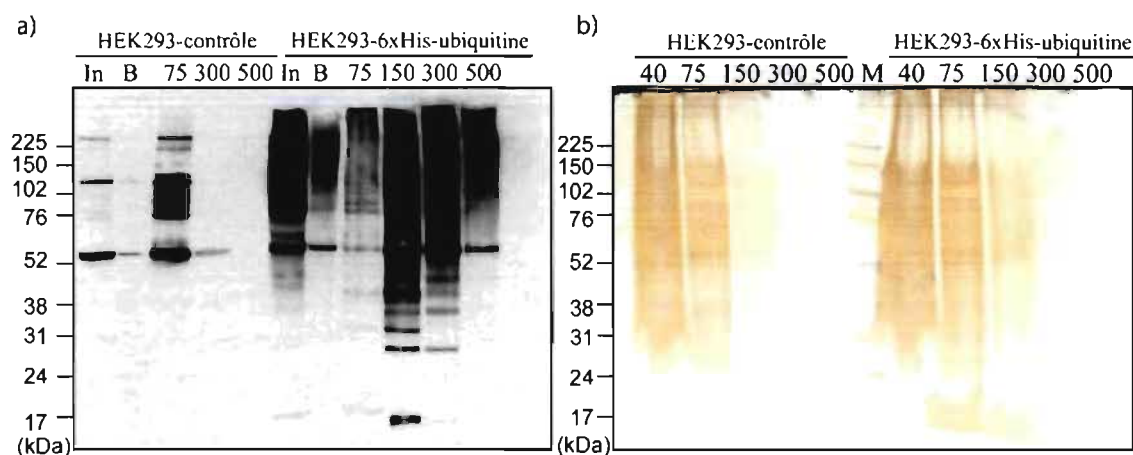


Figure 3.17 : Purification des protéines ubiquitinées à partir d'un lysat de cellules HEK 293 transfectées avec 6xHis-ubiquitine sur colonne de Ni-NTA.

a) Immunobuvardage anti-ubiquitine de la purification sur billes de Ni-NTA pour des cellules HEK 293 transfectées par 6xHis-ubiquitine ou le plasmide contrôle. Lysat initial (10%, In), les billes (B) après l'élution et 2% des éluions d'imidazole (40, 75, 150, 300 et 500 mM d'imidazole) sont déposés sur le gel. **b)** Gel coloré à l'argent de la purification sur billes de Ni-NTA pour des cellules HEK 293 transfectées par 6xHis-ubiquitine ou le plasmide contrôle. Les éluions d'imidazole (10% de 40, 75, 150, 300 et 500 mM d'imidazole) sont déposés sur le gel.

L'immunobuvardage anti-ubiquitine ainsi que le gel coloré à l'argent illustrent clairement l'efficacité de l'élution à l'aide d'un gradient imidazole (figure 3.17). Un lavage avec 40 et 75 mM d'imidazole permet d'éluer la majeure partie des protéines contaminantes. En effet, des protéines sont visibles sur le gel coloré à l'argent dans les puits indiqués 40 et 75 mM des cellules HEK 293 transfectées par le plasmide contrôle mais sont pratiquement absentes dans les puits suivants. Les signaux histidines détectés par immunobuvardage dans les puits du lysat initial et de l'élution 75 mM imidazole pour les cellules non transfectées peuvent provenir de protéines riches en histidines ou alors ce sont des signaux non spécifiques provenant de l'anticorps. Les fractions 150 et 300 mM d'imidazole ont été combinées et fractionnées sur une colonne SCX artisanale suivie de l'analyse par nanoLC-MS/MS. Les données sont traitées de façon similaire aux données obtenues par l'approche basée sur Rad23. La limite sur les scores des

identifications de Mascot a été fixée à 25 pour avoir un taux de faux positifs inférieur à 1% pour les 2 échantillons. Des cartes peptidiques sont réalisées à l'aide du logiciel MassSense pour les deux conditions soit les cellules HEK 293 transfectées par le plasmide contrôle et les cellules transfectées par 6xHis-ubiquitine (figure 3.18). Tel qu'attendu, il y a peu de peptides présents dans l'échantillon transfecté par le plasmide contrôle. Cette approche est donc très efficace pour réduire la présence de protéines se liant de façon non spécifique.

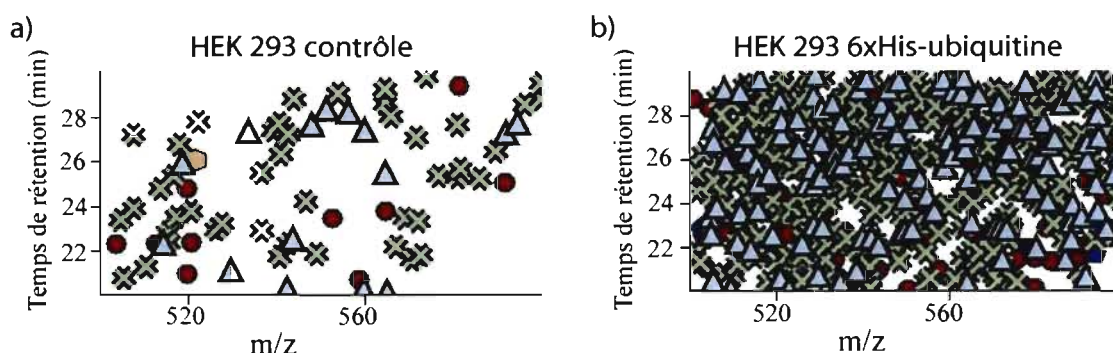


Figure 3.18 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon transfecté par le plasmide contrôle (a) et de l'échantillon transfecté par 6xHis-ubiquitine (b).

Les peptides séquencés par Mascot à partir des spectres MS/MS obtenus sont ensuite regroupés et alignés avec les pics des spectres MS par le logiciel MassSense. Avec ces résultats, il est possible de tracer une distribution d'intensité de ces groupes de peptides selon leur appartenance aux 2 échantillons (figure 3.19 et tableau 3.3).

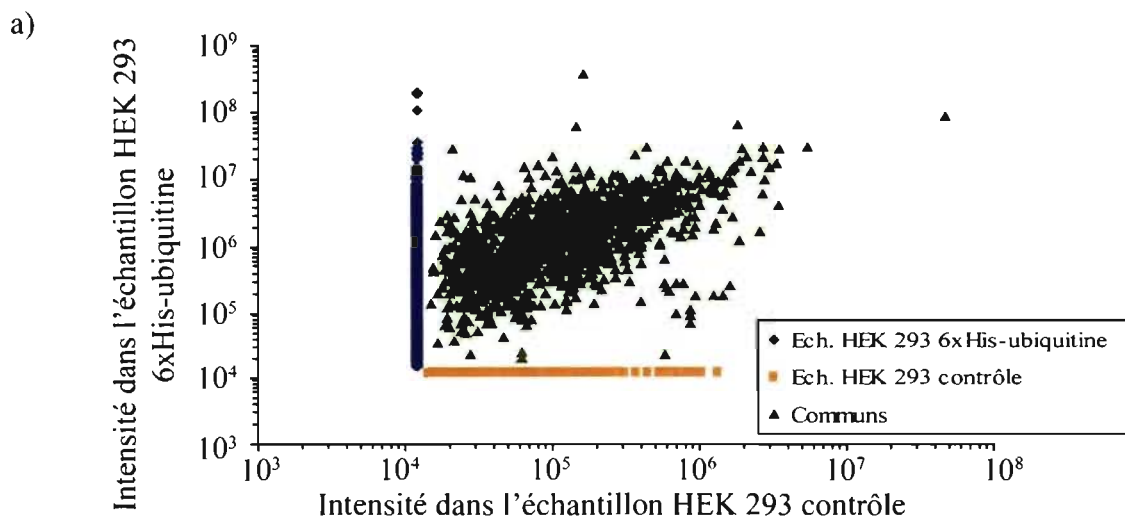


Figure 3.19 : Regroupement similaire de l'intensité des peptides à travers les échantillons. a) Distribution d'intensité des groupes de peptides selon leur présence dans l'échantillon de HEK 293 contrôle ou HEK 293 transfecté 6xHis-ubiquitine.

Tableau 3.3 : Tableau représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.

b)	Groupes de peptides	%
Échantillon HEK 293-6xHis-Ubiquitine	4418	77,3
Échantillon HEK 293-contrôle	155	2,7
Communs	1140	20,0
Total	5713	-

Selon cette distribution, 4418 groupes de peptides ont été identifiés uniquement dans l'échantillon transfecté soit 77,3%. Ces peptides sont considérés comme appartenant à une protéine ubiquitinée ou à une protéine associée aux protéines ubiquitinées. De plus, 1140 groupes de peptides sont communs aux deux échantillons soit 20% et 155 groupes de peptides sont présents uniquement dans l'échantillon transfecté avec le plasmide contrôle (2,7%). Les peptides identifiés seulement dans l'échantillon transfecté correspondent à 905 protéines uniques soit 77,8% des protéines totales identifiées. Ce pourcentage de protéines uniques est légèrement supérieur à celui obtenu par l'approche Rad23 (73,8%). Ceci indique que les billes de Ni-NTA

permettent d'obtenir un meilleur taux d'enrichissement puisqu'il y a seulement environ 20% des protéines qui sont communes ou présentes uniquement dans le contrôle négatif. Ainsi, il y a donc 180 protéines communes entre les deux échantillons soit 15,5% et 78 protéines uniquement présentes dans l'échantillon non transfecté soit 6,7%.

Le nombre de protéines identifiées (905) est 2 fois plus élevé que celui pour l'approche Rad23 (447). Cette valeur peut paraître élevée par contre, contrairement à Rad23 qui possède une certaine spécificité, cette approche ne fait aucune distinction entre les protéines mono-ubiquitinées et celles polyubiquitinées, ni entre les différents types de chaîne d'ubiquitine. Il est donc attendu que le nombre de protéines identifiées soit plus grand. Les protéines identifiées peuvent être classées en différentes catégories fonctionnelles (figure 3.20). Malgré un nombre plus grand d'identifications, les pourcentages associés à chacune des catégories sont similaires à ceux obtenus pour l'approche Rad23. Près de la moitié des protéines sont impliquées au niveau du métabolisme alors qu'il y a 5% de protéines reliées à la voie de dégradation du protéasome. Plusieurs enzymes E3 ligases (7), enzymes d'activation E2 (11), une E1, et des enzymes de déubiquitination (USP7, USP9, USP11, USP13, USP14, USP22 et USP24) ont aussi été identifiées.

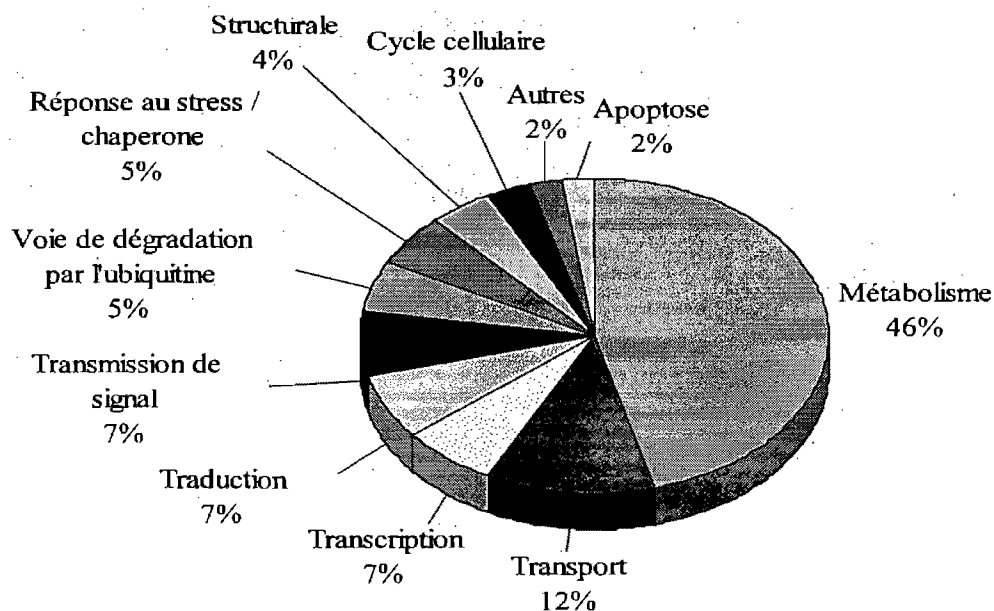


Figure 3.20 : Distribution des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes classes fonctionnelles.

Par une recherche d'homologie, il est possible d'obtenir une liste de protéines homologues chez l'humain pour les protéines identifiées chez la souris par l'approche Rad23. Ainsi, 25% des protéines identifiées à l'aide de Rad23 sont de nouveau identifiées par l'approche sur les billes de Ni-NTA soit 81 protéines. Ce faible recouvrement peut s'expliquer par le fait que Rad23 possède une certaine spécificité alors que les billes de Ni-NTA vont lier toutes les protéines ubiquitinées. De plus, le type cellulaire et la méthode de préparation sont différents et il est possible que la composition des différents tampons de lavage influence la nature des protéines identifiées dans l'échantillon final.

3.2.7. Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon de protéines enrichi sur billes de Ni-NTA

L'analyse par MS/MS de l'échantillon enrichi sur colonne de Ni-NTA a permis d'identifier 17 sites d'ubiquitination sur 14 protéines. Tel que précédemment, ces sites ont été validés manuellement et la grande précision de masse du LTQ-Orbitrap permet un plus grand niveau de confiance. Les spectres MS/MS de 4 de ces sites sont présentés à la figure 3.21. Ces résultats confirment la possibilité de la multi-ubiquitination sur une même protéine, tel que publié par Peng *et al.* [9]. Quelques-unes des protéines sont discutées plus en détails dans les paragraphes suivants et un tableau récapitulatif est présenté (tableau 3.4).

Tout d'abord, 3 sites ont été identifiés chez des protéines ribosomales de la sous-unité 40S : la K77 de la sous-unité S13, la K48 de la sous-unité S17 et la lysine 214 de la sous-unité S3. Concernant la sous-unité S3, l'accumulation d'une forme ubiquitinée de celle-ci a été détectée *in vivo* par immunobuvardage lorsqu'un inhibiteur du protéasome est utilisé [102]. De plus, une étude des substrats ubiquitinés dans les cellules HEK 293 a identifié 3 lysines de la sous-unité S3, les K75, K141 et K197 [39]. Cette étude a aussi rapporté 2 sites d'ubiquitination sur la protéine HSP70, les K507 et K524. L'isoforme 2 de cette protéine est identifié dans l'échantillon enrichi et le peptide portant l'adduit diglycine sur la K507 a aussi été séquencé.

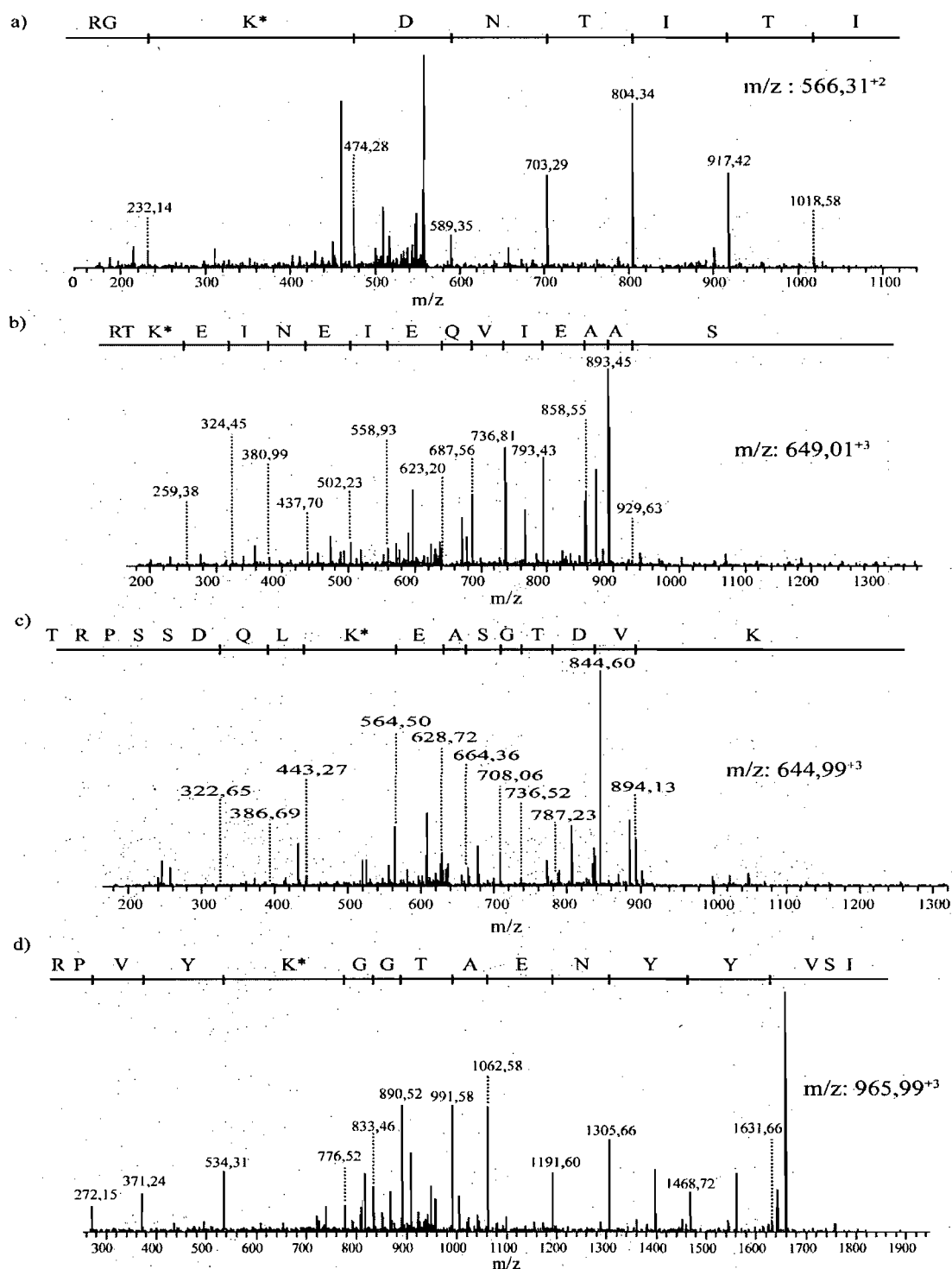


Figure 3.21 : Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine. a) HSP70 (fragments y identifiés). b) Rad18 (fragments y⁺⁺ identifiés). c) Isoforme 1 de la Spartine (fragments b⁺⁺). d) Chaîne bêta de la tubuline (fragments y identifiés).

Tableau 3.4 : Sites d'ubiquitination identifiés par l'approche basée sur la transfection de 6xHis-ubiquitine. Le peptide séquencé, la position de la lysine modifiée ainsi que la différence de masse entre la masse moléculaire observée et théorique du peptide sont présentés.

Protéines	Peptides	Position	$\Delta m/z$ (ppm)
Protéine 21 kDa	FFEVLIDPFHK*AIR	K122	-0,57
Sous-unité S13, protéine ribosomale 40S	SK*GLAPDLPEDLYHLIK	K77	-2,68
Sous-unité S17, protéine ribosomale 40S	NK*IAGYVTHLMK	K48	-0,08
Sous-unité S3, protéine ribosomale 40S	KLPDPHVSIVEPK*DEILPTTPISEK	K214	0,72
Protéine 2 de type choc thermique de 70 kDa	ITITNDK*GR	K507	-0,60
Isoforme 1 de la Spartine	TRPSSDQLK*EASGTDVK	K362	-1,05
Transporteur 1 de monocarboxylate	K*DLHDANTDLIGR	K224	-2,42
Protéine de réparation post-réplication RAD18	RPEPPSTSTLK*QVTK	K197	-1,41
Protéine de réparation postréplication RAD18	SAAEIVQEIENIEK*TR	K309	-3,72
Protéine RWDD3	YVKIVEK*	K147	2,34
Hydrolase S-formylglutathion	QISSNK*CFGGLQK	K10	-6,09
Tubuline chaîne alpha-3	VGINYQPPTVVPGGDLAK*VQR	K370	-2,25
Tubuline chaîne alpha-6	QLFHPEQLITGK*EDAANNYAR	K96	1,18
Tubuline chaîne alpha-6	DVNAAIATIK*TK	K336	-4,63
Tubuline chaîne bêta	ISVYYNEATGGK*YVPR	K58	0,82
Tubuline chaîne bêta	MSMK*EVDEQMLNVQNK	K324	-0,30
Protéine tyrosine-phosphatase, non-récepteur type 14	QK*MAGLEAQK	K854	5,29

La stratégie de purification sur colonne de Ni-NTA devrait permettre d'identifier des protéines mono-ubiquitinées et nous croyons en avoir identifiées une puisqu'un site d'ubiquitination a été séquencé sur l'isoforme 1 de la protéine Spartine. En effet, cette protéine a un rôle dans la régulation de l'endocytose du récepteur épidermal du facteur de croissance (EGFR) et sa mono-ubiquitination a été démontrée à l'aide de différentes formes tronquées de la protéine dans une lignée cellulaire humaine [103]. Le site identifié, la K362, corréle avec ces résultats puisqu'aucune mono-ubiquitination n'est détectée pour un mutant composé des 206 premiers acides aminés de la protéine alors que la mono-ubiquitination est détectée pour tous les autres mutants c'est-à-dire formés des 406 premiers acides aminés ou des acides aminés 210 à 666 ou des acides aminés 210 à 416.

Ensuite, 2 sites d'ubiquitination ont été identifiés sur la protéine de réparation post-réplication Rad18 soit la K197 et K309. Celle-ci est une enzyme E3 ligase dont le rôle est de mono-ubiquitiner l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) [104]. Un des sites identifiés, la K309 a été reportée comme site d'autoubiquitination de Rad18 lors d'un essai d'ubiquitination *in vitro* [105].

Plusieurs sites ont été identifiés sur la tubuline, une protéine structurale formant les microtubules dans la cellule [106]. Elle est donc abondante dans la cellule et la possibilité de séquencer une forme modifiée de ses peptides est plus grande. En effet, 5 sites ont été identifiés sur des isoformes alpha et bêta de la tubuline. La structure tridimensionnelle de l'isomère alpha, disponible sur le site internet de la Protein Data Bank, permet de situer les 3 lysines identifiées soit les K96, K336 et K370. Elles sont toutes les 3 exposées à la surface et une seule est située sur une hélice α (figure 3.22). Ceci corrèle avec une étude bioinformatique reportant une préférence pour l'ubiquitination sur des lysines situées d'abord sur des boucles et ensuite sur des hélices [100].

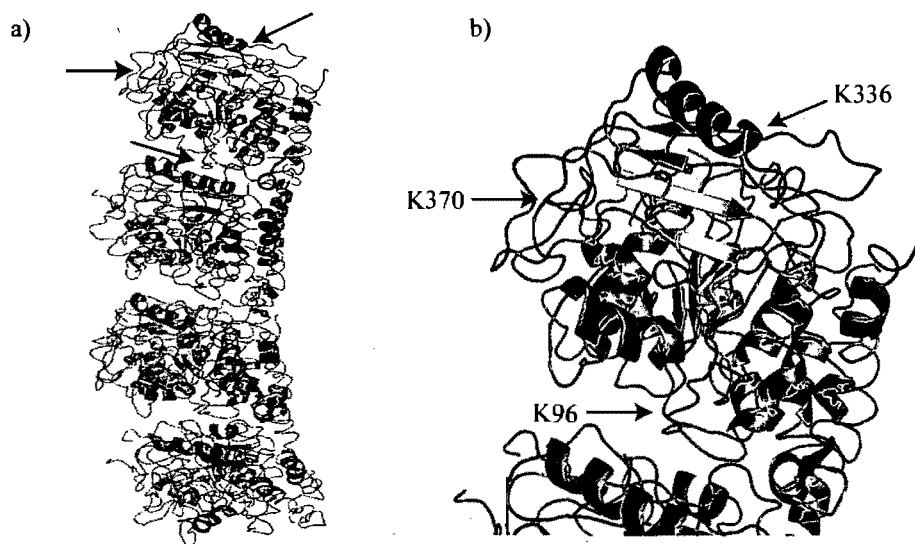


Figure 3.22: Structure tridimensionnelle d'une chaîne alpha de la tubuline.
a) Vue d'ensemble. b) Plan rapproché des sites d'ubiquitination identifiés
(Source : Protein Data Bank, code 1FFX).

Pour conclure, la purification à l'aide de la forme modifiée 6xHis-ubiquitine sur colonne de Ni-NTA a permis l'identification de plus de 1100 protéines uniques ainsi que 18 sites d'ubiquitination sur 15 protéines. Ces résultats se comparent aux résultats obtenus par Peng *et al.* au niveau du nombre d'identifications cependant, le nombre de sites d'ubiquitination identifié est inférieur [9]. Ceci pourrait s'expliquer en considérant que 80 fractions de SCX ont été analysées dans cette publication. Ainsi, la déplétion des protéines est plus grande ce qui permet d'identifier des peptides de plus faible abondance. Cette approche de transfection permet tout de même une plus grande identification de protéines ubiquitinées comparativement à l'approche basée sur l'utilisation de Rad23, par contre, il n'y a aucune spécificité entre les protéines mono-ubiquitinées et les différentes chaînes de polyubiquitine. De plus, il y a une limitation au niveau des modèles biologiques étudiés puisqu'il faut recourir à une transfection pour exprimer la forme 6xHis-ubiquitine ou créer des modèles transgéniques exprimant la forme modifiée de façon stable.

3.2.8. Identification de sites d'ubiquitination sur l'ubiquitine

Les différentes analyses au spectromètre de masse, en plus de permettre d'identifier de nouveaux sites d'ubiquitination, ont permis de séquencer les peptides signatures des différents types de chaînes d'ubiquitine. Lors d'études *in vivo*, les 7 lysines de l'ubiquitine ont été identifiées comme étant ubiquitinées chez la levure et 6 des lysines chez l'humain, soit la K6, K11, K27, K33, K48 et K63 [9, 39, 76]. La purification à l'aide de Rad23 a permis d'identifier les peptides signatures des lysines 6, 11, 27, 48 et 63 alors que l'approche avec l'ubiquitine 6xHis a identifié les lysines 11, 33, 48 et 63. Les spectres des 3 peptides signatures les plus abondants sont présentés à la figure 3.23. Un tableau récapitulatif des peptides signatures avec leur intensité selon la méthode de purification est présenté au tableau 3.5. Lorsque la purification se fait sur la colonne de Rad23, l'ordre d'abondance des peptides signatures est le suivant K48 > K11 > K63 > K6 > K27 alors que pour la purification sur billes de Ni-NTA l'ordre est le suivant : K48 > K63 > K11 > K33. Tel qu'attendu, le peptide provenant de chaînes liées par la K48 est le plus abondant. En effet, ce type de chaîne est le principal signal pour la

dégradation par le protéasome [7]. Pour la purification sur billes de Ni-NTA, l'ordre d'abondance est le même que celui détecté chez la levure par une approche de purification similaire [9]. De plus, une étude d'ubiquitination *in vitro* a démontré que les chaînes liées par les K48, K63 ou K11 peuvent être liées par des récepteurs de l'ubiquitine et dégradées par le protéasome [107]. Par contre, les chaînes liées par la K63 régulent d'abord des processus indépendants du protéasome tels la transmission de signal et la réparation de l'ADN [108]. Les fonctions précises des chaînes K6, K11, K27 et K33 sont quant à elles peu connues [39].

Tableau 3.5 : Intensité des sites d'ubiquitination identifiés sur l'ubiquitine pour la purification sur colonne d'affinité Rad23 et sur colonne de billes de Ni-NTA.

Colonne d'affinité Rad23		
Peptide	Lysine modifiée	Intensité (comptes)
LIFAGK*QLEDGR	K48	$4,0 \times 10^8$
TLTGK*TITLEVEPSDTIENVK	K11	$1,9 \times 10^7$
TLSDYNIQK*ESTLHLVLR	K63	$1,3 \times 10^7$
MQIFVK*TLTGK	K6	$4,1 \times 10^6$
TITLEVEPSDTIENVK*AK	K27	$1,9 \times 10^6$
Colonne de billes de Ni-NTA		
Peptide	Lysine modifiée	Intensité (comptes)
LIFAGK*QLEDGR	K48	$3,2 \times 10^8$
TLSDYNIQK*ESTLHLVLR	K63	$2,7 \times 10^7$
TLTGK*TITLEVEPSDTIENVK	K11	$3,6 \times 10^6$
IQDK*EGIPPDQQR	K33	$2,0 \times 10^5$

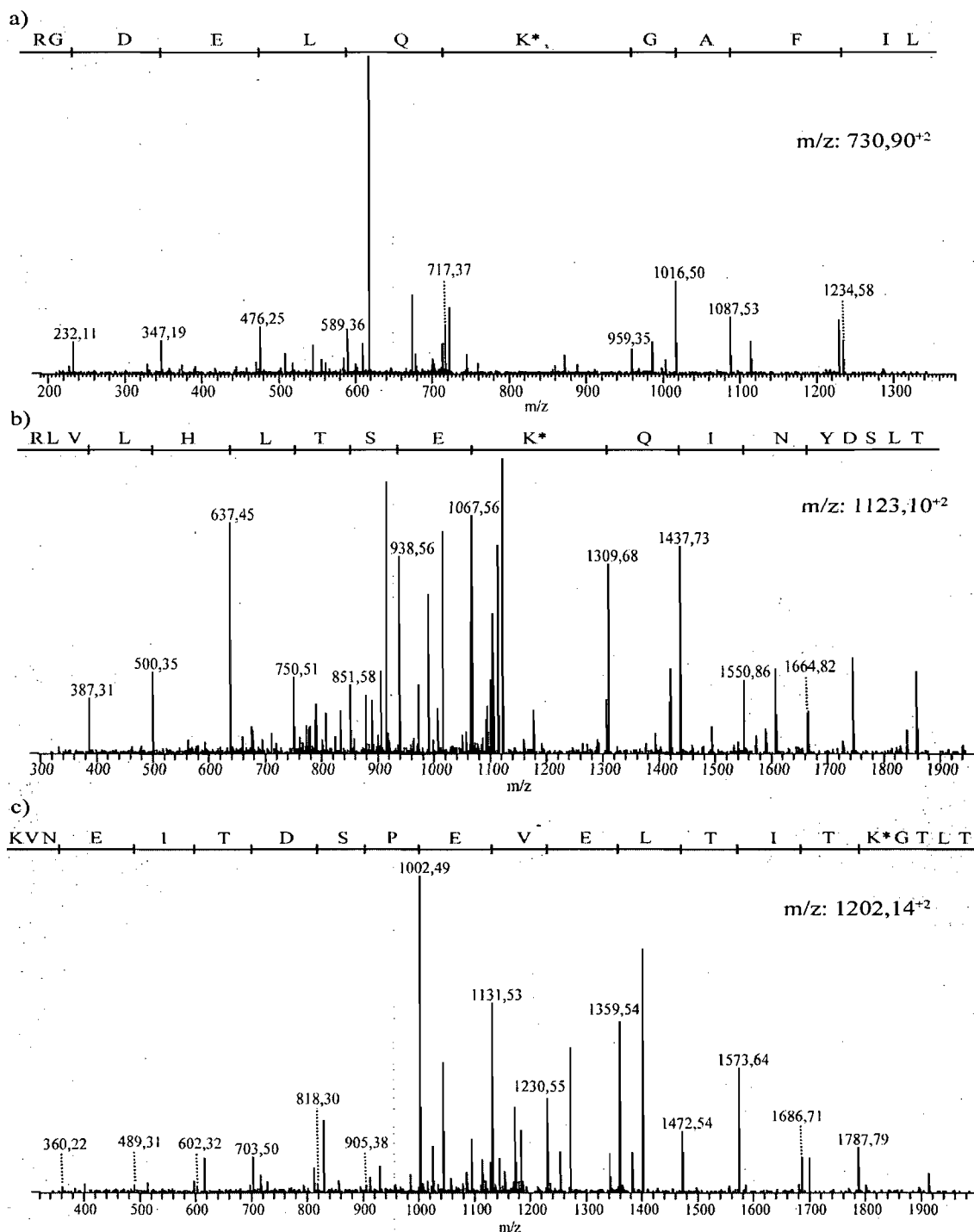


Figure 3.23: Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine sur l'ubiquitine. a) Peptide signature de chaînes liées par la K48 (LIFAGK*QLEDGR). b) Peptide signature de chaînes liées par la K63 (TLSDYNIQK*ESTLHLVLR). c) Peptide signature de chaîne liées par la K11 (TLTGK*TITLEVEPSDTIENVK) de l'ubiquitine. Les séries d'ions y ont été identifiés.

3.3. Conclusion

Pour conclure, nos résultats démontrent que les 2 stratégies de purification proposées fonctionnent bien, que ce soit à l'aide d'une colonne d'affinité composée de Rad23 ou de billes de Ni-NTA. L'approche basée sur l'utilisation de Rad23 possède une bonne spécificité vis-à-vis des substrats ciblés pour la dégradation protéasomale et permet une identification de près de 450 protéines potentiellement ubiquitinées ou s'associant aux protéines ubiquitinées. L'approche a permis d'identifier 2 nouveaux sites d'ubiquitination soit la K195 de la sous-unité alpha type 4 du protéasome et la K850 de la sous-unité 10 du facteur eukaryotique 3 d'initiation de la traduction. De plus, un site d'ubiquitination a été détecté sur les K6, K11, K27, K33, K48 et K63 de l'ubiquitine.

En ce qui concerne l'approche basée sur la transfection de la forme 6xHis-ubiquitine, plus de 900 protéines potentiellement ubiquitinées ou associées ont été identifiées. Cette purification ne possède aucune spécificité puisque presque toutes les protéines liées à l'ubiquitine vont se lier sur les atomes de nickel de la colonne Ni-NTA. Ainsi, il est possible d'identifier des protéines mono-ubiquitinées. L'analyse par MS/MS a permis d'identifier 17 sites d'ubiquitination sur 14 protéines.

Il aurait été intéressant de comparer ces résultats avec un enrichissement en conditions dénaturantes afin de départager les protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées de ces dernières. En s'inspirant des résultats obtenus par Matsumoto *et al.*, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'environ 50% des protéines identifiées dans les 2 approches sont des protéines interagissant avec les protéines ubiquitinées [39]. La stratégie serait alors d'effectuer la lyse en conditions dénaturantes pour dissocier les complexes de protéines et ensuite d'effectuer la purification. Enfin, un meilleur fractionnement sur la colonne SCX aurait permis un plus grand nombre d'identifications bien que nécessitant une plus grande quantité de protéines au départ et un temps d'analyse plus long en spectrométrie de masse.

4. Méthode de purification à 2 étapes

4.1. Introduction

Depuis quelques années, les stratégies de purification à 2 étapes ont fait leurs preuves concernant la réduction de la contamination par des protéines non spécifiques [109]. En effet, l'utilisation d'une purification en conditions dénaturantes n'est pas suffisante pour réduire complètement la présence de protéines co-purifiantes puisqu'il a été démontré qu'une fraction significative (0,5 – 1%) d'extraits cellulaires totaux de levure se lie sur les résines utilisées [74], [4].

Pour les protéines ubiquitinées, le groupe de Deshaies propose une approche combinant l'utilisation de protéines possédant un domaine liant l'ubiquitine suivie d'une purification en conditions dénaturantes sur colonne de Ni-NTA grâce au motif 6xHis ajouté à l'ubiquitine [28]. Cette approche leur a permis d'identifier 225 protéines ubiquitinées s'accumulant suite à l'inhibition du protéasome chez la levure. En combinant ces 2 approches, l'enrichissement de l'échantillon en protéines polyubiquitinées peut atteindre un facteur de 3000 à 5000 fois, comparativement à un facteur d'environ 100 à 200 fois pour la colonne de Ni-NTA seule [28]. Bien sûr, le désavantage est la très grande quantité de matériel de départ qu'une telle approche exige puisqu'il y a des pertes non négligeables associées à chacune des étapes.

À ce jour, une seule étude connue des protéines ubiquitinées combinant 2 étapes d'affinité a été réalisée chez les mammifères. Celle-ci est basée sur l'utilisation d'un motif 6xHis-biotine sur l'ubiquitine [32]. La purification se fait en condition totalement dénaturante et les protéines sont d'abord purifiées sur une colonne de Ni-NTA suivie d'une résine streptavidine. Les auteurs ont démontré l'efficacité de l'approche à petite échelle chez la levure et les cellules humaines HeLa, par contre seule la purification à l'échelle du protéome chez la levure a été suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Cette stratégie leur a permis d'identifier 258 protéines ce qui est comparable aux études antérieures composées de 2 étapes de purification [28].

Dans le chapitre précédent, l'efficacité d'une purification à l'aide d'une protéine possédant un domaine UBA, Rad23, et celle d'une purification sur colonne de Ni-NTA à l'aide d'une forme 6xHis-ubiquitine ont été démontrées. Afin de combiner les avantages des deux méthodes de purification, elles sont réalisées l'une à la suite de l'autre. Cette purification par affinité à 2 étapes chez des cellules humaines est évaluée dans le présent chapitre.

4.2. Résultats et discussion

La totalité des études par spectrométrie de masse à l'échelle du protéome sur les protéines ubiquitinées parues à ce jour et faisant appel à une purification par affinité à 2 étapes ont été réalisées chez la levure. Des cellules humaines, les HEK 293 sont utilisées pour le présent projet. L'approche proposée est inspirée de celle développée chez la levure [28, 101]. D'abord, les cellules sont transfectées afin qu'elles expriment une forme modifiée de l'ubiquitine soit 6xHis-ubiquitine. Ensuite, une première étape de purification est réalisée sur une colonne formée par la protéine Rad23, telle qu'optimisée dans le chapitre précédent. Puisque Rad23 possède une certaine spécificité, les chaînes d'ubiquitine liées par la K48 seront préférentiellement purifiées. De plus, cette étape doit être réalisée en conditions natives afin que Rad23 conserve ses propriétés de liaison. Par la suite, la purification sur colonne de Ni-NTA pouvant être réalisée en conditions dénaturantes, l'élution de la colonne Rad23 se fera avec un tampon dénaturant. Ainsi, la majorité des interactions protéines-protéines seront brisées et peu de protéines co-purifiant avec les protéines ubiquitinées seront présentes dans l'échantillon final [9]. Un schéma de l'approche générale est illustré à la figure 4.1

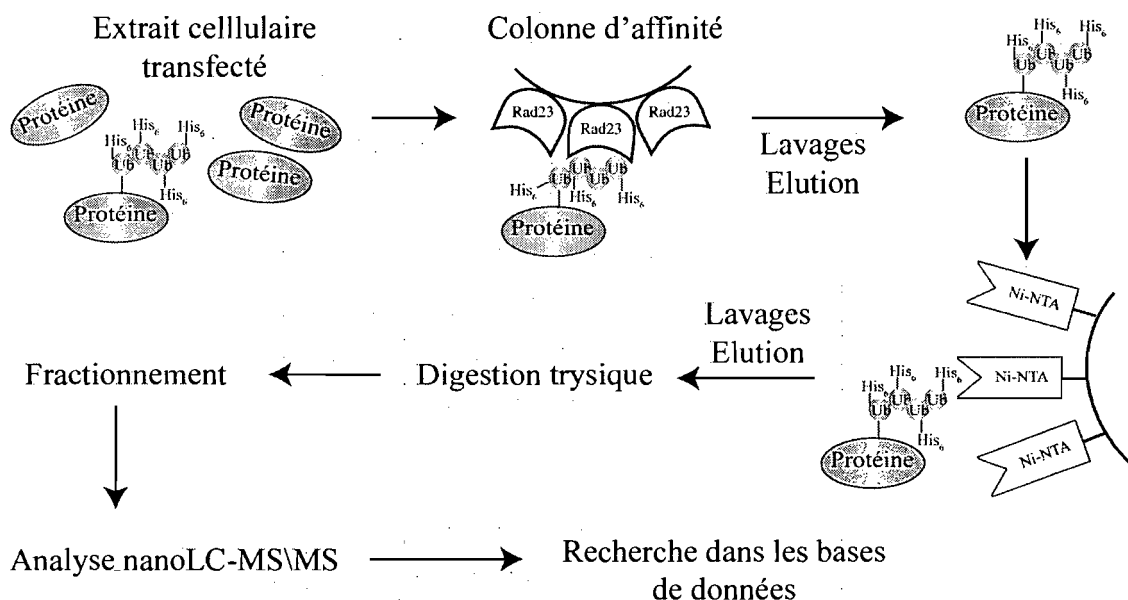


Figure 4.1: Purification des protéines par chromatographie d'affinité à 2 étapes.

4.2.1. Analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon enrichi par l'approche à 2 étapes

L'échantillon enrichi est préparé à partir d'un lysat cellulaire de HEK 293 transfectées avec 6xHis-ubiquitine purifié par affinité sur les billes de Rad23 suivi de billes de Ni-NTA en conditions dénaturantes. Les 2 étapes de purification, dont une étape en conditions dénaturantes, devraient réduire considérablement la présence de protéines co-purifiant avec les protéines ubiquitinées que ce soit parce qu'elles interagissent avec les protéines ubiquitinées ou parce qu'elles se lient de façon non spécifique sur les résines utilisées. Environ 120 mg de lysat cellulaire ont été utilisés pour une purification à grande échelle. Tel que précédemment, tout au long de la préparation de l'échantillon, des aliquots ont été collectés afin de pouvoir contrôler l'efficacité de la purification par immunobuvardage anti-histidine et par coloration à l'argent sur gel.

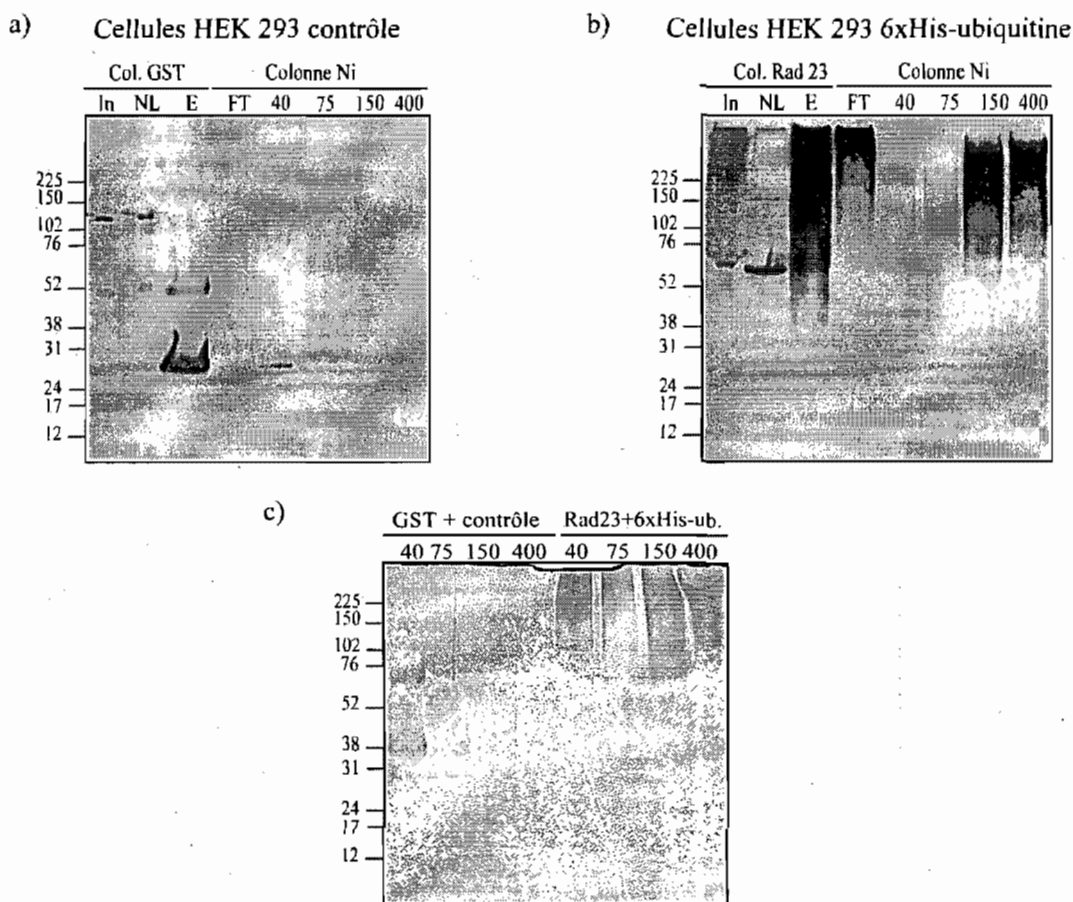


Figure 4.2 : Purification des protéines ubiquitinées d'un lysat cellulaire de HEK 293 par la stratégie à 2 étapes. Immunobuvardage anti-histidine de l'échantillon purifié sur colonne GST (a) ou Rad23 (b) suivie d'une purification sur billes de Ni-NTA pour l'échantillon non transfecté. Les aliquots suivants ont été déposés sur gel : 0,1% du lysat initial (In), 5% de la fraction non liée des colonnes GST, Rad23 ou Ni (NL), 5% de l'éluat de la colonne GST ou Rad23 (E) et 2% des éluions d'imidazole de la colonne de Ni-NTA (40, 75, 150 et 400 mM). c) Coloration à l'argent de 10% des éluions du gradient d'imidazole (40, 75, 150 et 400 mM) de la colonne de Ni-NTA pour les échantillons transfectés ou non.

Les immunobuvardages anti-histidine présentés à la figure 4.2 a) et b) indiquent clairement l'efficacité de chacune des étapes de la purification. D'abord, aucune traînée caractéristique de l'ubiquitination n'est détectée pour le contrôle négatif, c'est-à-dire des cellules transfectées avec le plasmide contrôle et incubées avec les billes de GST suivi

d'une incubation avec des billes de Ni-NTA (figure 4.2 a). Les quelques bandes détectées proviennent possiblement de protéines riches en histidines ou de signaux non spécifiques de l'anticorps anti-histidine [76]. Pour ce qui est des cellules transfectées avec 6xHis-ubiquitine, la première purification sur Rad23 a très bien fonctionné puisqu'un fort signal d'ubiquitination est détecté dans le puits correspondant à l'éluat. Ensuite, la majorité des protéines ubiquitinées de la première colonne est récupérée par les billes de Ni-NTA tel que démontré par le faible signal ubiquitine dans la fraction non liée de cette colonne (figure 4.2 a). Ces billes sont ensuite lavées avec un tampon contenant 40 mM d'imidazole pour éluer les protéines liées non spécifiquement. Finalement, un gradient d'élution est réalisé avec des tampons ayant une concentration croissante en imidazole. Le gel coloré à l'argent d'une fraction de chaque élution pour les 2 échantillons permet d'évaluer la complexité de l'échantillon et la présence de protéines contaminantes (figure 4.2 c). Les puits correspondants à l'échantillon contrôle contiennent très peu de protéines, en effet la seule bande majoritaire correspond au poids moléculaire de la GST elle-même. Ainsi, l'approche de 2 colonnes de purification par affinité est efficace selon les résultats de la coloration à l'argent. D'après l'intensité de la traînée de l'échantillon transfecté, l'élution à 150 mM d'imidazole contient la grande majorité des protéines ubiquitinées. Cette élution ainsi que celle à 400 mM sont conservées et fractionnées individuellement, puis l'analyse au spectromètre de masse LTQ-Orbitrap est effectuée.

Le traitement des données s'effectue tel que présenté précédemment. Le regroupement similaire par MassSense permet de tracer les cartes peptidiques obtenues pour chacune des fractions SCX des échantillons et d'obtenir une valeur d'intensité pour chaque valeur m/z associée à un certain temps de rétention. Les cartes illustrent bien la différence de population comme démontré par la coloration à l'argent du gel (figure 4.3).

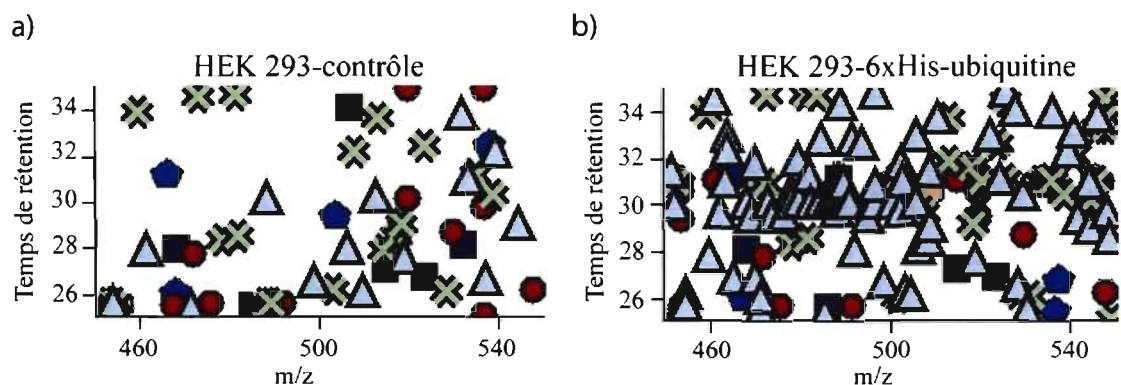


Figure 4.3 : Différence de population des échantillons contrôle et enrichi en protéines ubiquitinées. Cartes peptidiques obtenues à partir du logiciel MassSense pour une fraction de sel de la colonne SCX de l'échantillon transfecté par le plasmide contrôle (a) et par 6xHis-ubiquitine (b).

Ensuite, la recherche dans la base de données IPI_Human_fr à l'aide de Mascot a été effectuée. La limite retenue sur les scores de Mascot a été fixée à 40 afin d'avoir un taux de faux positif de moins de 1% pour la suite de l'analyse des résultats. Le logiciel MassSense permet de tracer des distributions d'intensités des peptides selon leur appartenance aux échantillons et ce pour les 2 éluions soit 150 mM et 400 mM imidazole (figure 4.4 et tableau 4.1).

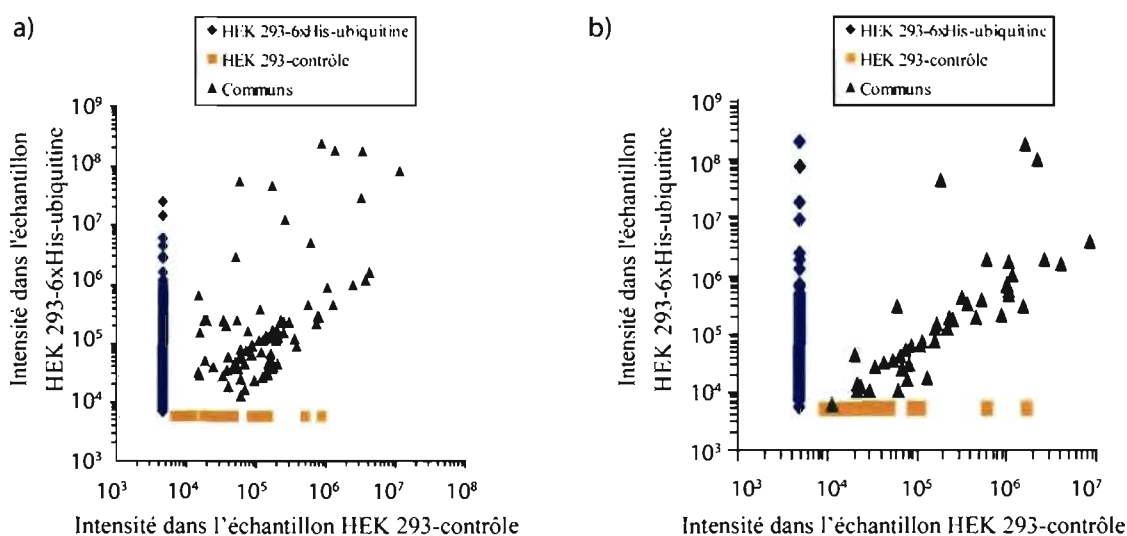


Figure 4.4 : Regroupement similaire des peptides à travers les échantillons. Distribution d'intensités des groupes de peptides selon leur appartenance aux échantillons transfectés 6xHis-ubiquitine ou non. **a)** Éluion 150 mM imidazole **b)** Éluion 400 mM imidazole.

Tableau 4.1 : Tableau récapitulatif du nombre de groupes de peptides pour chaque échantillon et selon l'éluion.

Échantillon	Éluion 150 mM		Éluion 400 mM	
	Groupes de peptides	Proportion (%)	Groupes de peptides	Proportion (%)
HEK 293-6xHis-ubiquitine	673	86,0	312	82,1
HEK 293-contrôle	33	4,2	21	5,5
Communs	77	9,8	47	12,4
Total	783	-	380	-

Selon ces distributions, la première constatation est le faible nombre d'identifications de peptides en communs et présents uniquement dans l'échantillon contrôle et ce pour les 2 éluions. L'éluion à 150 mM imidazole contient légèrement plus de groupes de peptides uniques (86%) comparativement à l'éluion à 400 mM imidazole (82%). L'éluion à 400 mM contient possiblement plus de protéines liées de façon non spécifique sur la résine d'agarose et qui éluent à cette forte concentration

d'imidazole. Malgré cela, le pourcentage de groupes de peptides uniques à l'échantillon enrichi en protéines ubiquitinées est environ 30% plus élevé que pour l'approche basée sur Rad23 uniquement (56,5%) et de 10% plus élevé que pour l'approche à une étape sur billes de Ni-NTA (77,3%). Tel que précédemment, seules les protéines ayant plus de 2 peptides séquencés ont été conservées pour la suite des analyses. Ainsi, pour l'élution à 150 mM imidazole, 246 protéines ont été identifiées uniquement dans l'échantillon transfecté 6xHis-ubiquitine (94,6%), 12 protéines sont communes aux 2 échantillons (4,6%) et 2 protéines sont uniques à l'échantillon contrôle (1,4%). Pour l'élution à 400 mM, 133 protéines uniques à l'échantillon transfecté 6xHis-ubiquitine sont identifiées (95,0%). Seulement 2 protéines sont communes (1,4%) et 5 protéines sont identifiées seulement dans le contrôle négatif (3,6%). La purification d'affinité à 2 étapes se révèle donc aussi efficace qu'attendu pour limiter la présence de protéines co-purifiantes quelle que soit la fraction d'élution analysée. Finalement, il y a 85 protéines communes entre les 2 éluions, soit près de 60% des protéines identifiées pour l'élution à 400 mM d'imidazole. Il est attendu que les 2 éluions soient différentes en ce qui concerne leur contenu en protéines puisque le tampon à 400 mM élue plus particulièrement des protéines plus fortement retenues sur les billes de Ni-NTA. Ainsi, elles ont possiblement un niveau de polyubiquitination plus élevé. Les protéines identifiées uniquement dans les échantillons transfectés 6xHis-ubiquitine, soient 294 protéines, ont été combinées et classées selon différentes catégories fonctionnelles (figure 4.5).

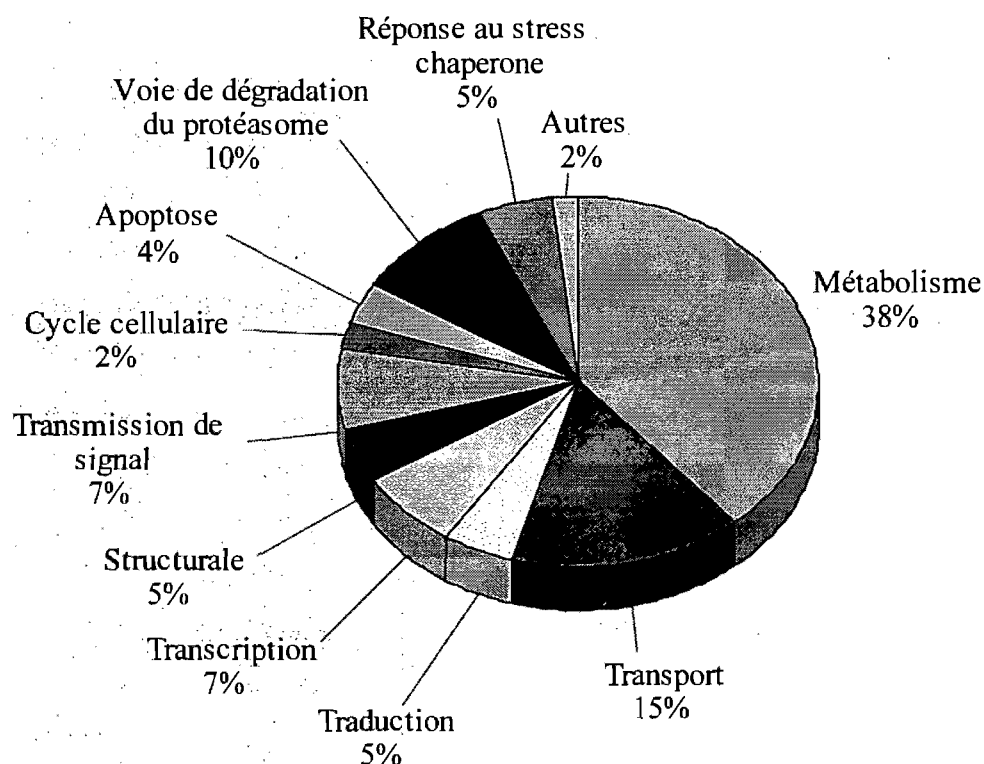


Figure 4.5 : Classement des protéines ubiquitinées identifiées selon différentes catégories fonctionnelles.

La principale différence entre cette répartition et celles obtenues précédemment se situe au niveau de la classe du métabolisme qui occupe moins d'importance au profit de la classe associée au protéasome et de celle du transport. Sachant que la double purification réduit la présence de protéines contaminantes, il est possible que la répartition obtenue donne une vision plus réaliste.

4.2.2. Identification de sites d'ubiquitination dans un échantillon purifié par l'approche à 2 étapes

L'analyse par MS/MS de l'échantillon préparé par le double enrichissement a permis d'identifier 3 sites d'ubiquitination sur 3 protéines différentes (tableau 4.2 et figure 4.7). Tel que précédemment, la grande précision de masse du LTQ-Orbitrap permet d'augmenter le niveau de confiance des sites identifiés. D'abord, un autre site appartenant à une sous-unité ribosomale a été séquencé. Cette fois, c'est la sous-unité

L15 du ribosome 60S. De nombreuses sous-unités de cette protéine ont été identifiées dans des études à grande échelle chez la levure [28]. La lysine modifiée, K83, est située dans une boucle facilement accessible, tel qu'illustré par la structure tridimensionnelle à la figure 4.6.

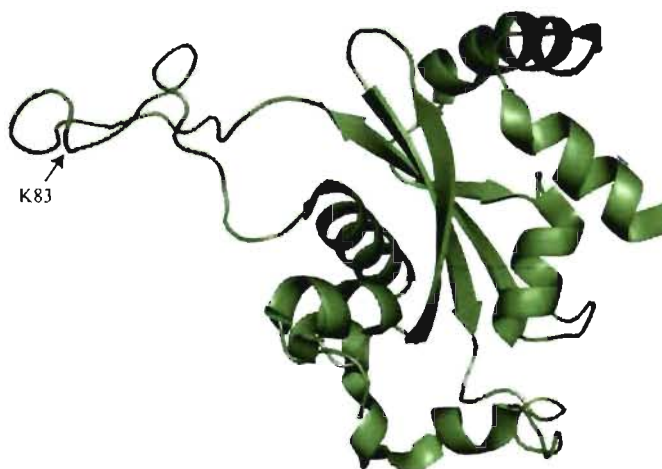


Figure 4.6 : Structure tridimensionnelle de la sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S (source : Protein Data Bank, code 2ZKR).

Ensuite, l'approche a permis d'identifier un site d'ubiquitination sur une autre protéine de type choc thermique de 70 kDa (HSP70), soit la K59 de la protéine 1B. En effet, l'approche sur billes de Ni-NTA avait identifié la protéine 2 de cette famille. Quelques isoformes de cette protéine ont été identifiés lors d'une étude similaire sur des cellules humaines [38]. Ce groupe de protéines fait parties des chaperons moléculaires puisqu'ils aident au repliement des protéines et à l'assemblage de polypeptides. Ils sont essentiels à l'homéostasie cellulaire et peuvent provoquer la dégradation par le système ubiquitine-protéasome si le repliement des protéines est incorrect [110].

Tableau 4.2 : Sites d'ubiquitination identifiés par l'approche à double purification. Le peptide séquencé, la position de la lysine modifiée ainsi que la différence de masse entre la masse moléculaire observée et théorique du peptide sont présentés.

Protéines	Peptides	Position	$\Delta m/z$ (ppm)
Sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S	GATYGK*PVHHGVNQLK	K83	-4,13
Protéine 1B de type choc thermique 70 kDa	QATK*DAGVIAGLNVLK	K59	-2,54
Isoforme 5 de l'antigène mineur H13 histocompatible	GK*NASDMPETITSR	K61	-1,74

En plus de ces 2 sites sur des familles de protéines identifiées par les approches précédentes, un site a été identifié sur un isoforme d'un antigène mineur H13 d'histocompatibilité (K61). La protéine antigène mineur H13 d'histocompatibilité est aussi appelé peptidase de peptide signal ou protéine 3 similaire à la presiniline. C'est une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique ayant une activité protéolytique [111]. Une portion significative des antigènes peptidiques présentés à la surface des cellules par les molécules MHC de classe 1 sont générés par le protéasome [1]. De plus, les antigènes mineurs d'histocompatibilité sont connus pour jouer un rôle dans les réactions de type GVHD (graft-versus-host-disease) [112].

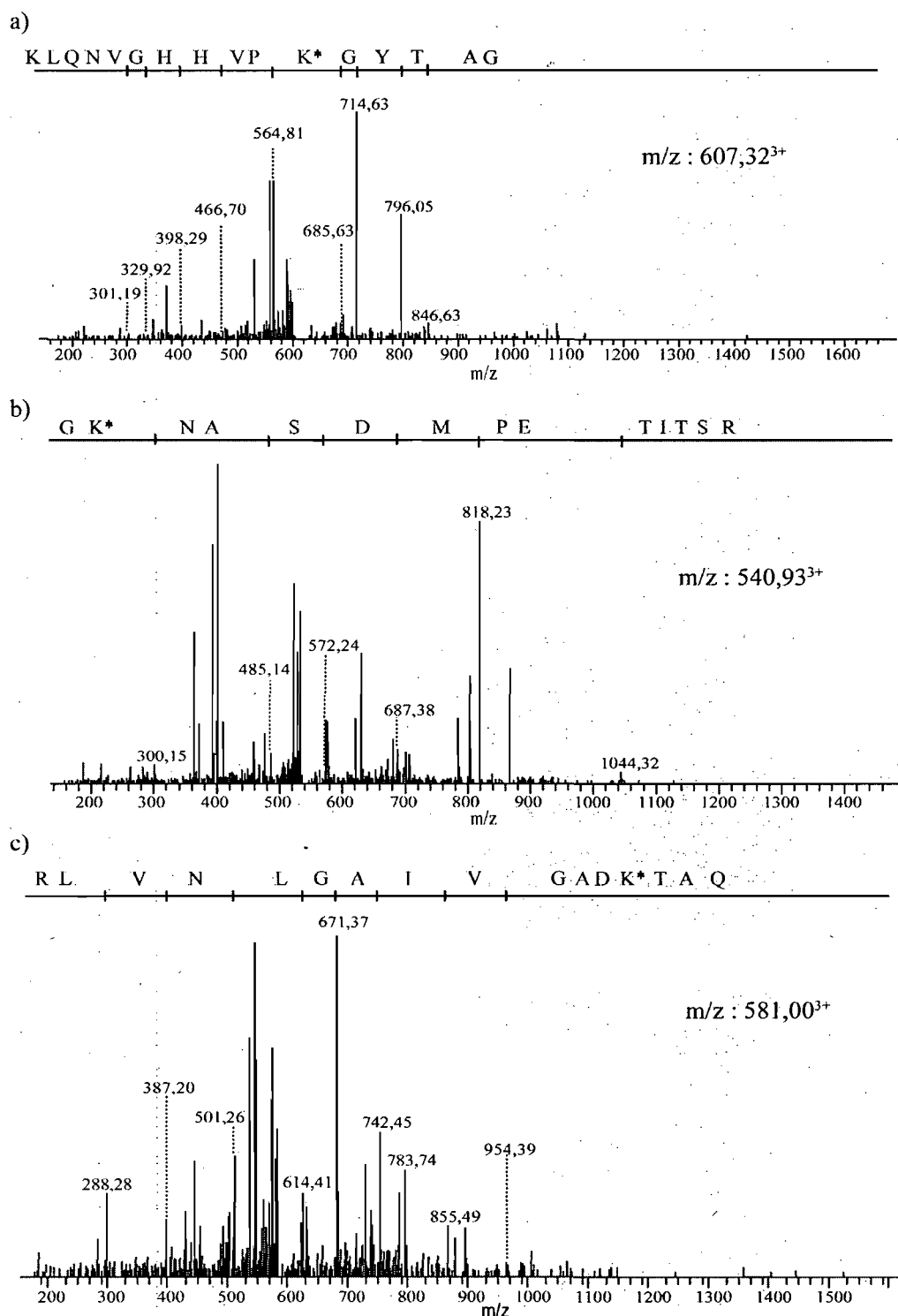


Figure 4.7: Spectres MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine a) Sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S (série d'ions y⁺⁺). b) Isoforme 5 de l'antigène mineur H13 histocompatible (série d'ions y). c) Protéine 1B de type choc thermique 70 kDa (série d'ions b).

4.2.3. Comparaison des approches à 1 et 2 étapes

Une comparaison entre les protéines identifiées par l'approche à 2 étapes et celles par l'approche utilisant uniquement la colonne d'affinité de Rad23 et de Ni-NTA a été faite. Les 2 purifications impliquant une transfection de 6xHis-ubiquitine ont été réalisées à partir de la même lignée cellulaire, les HEK 293. Pour l'approche basée sur Rad23, une recherche d'homologues chez l'humain a été effectuée à partir de l'outil Ensembl. La figure 4.8 illustre les résultats de cette comparaison. Ce diagramme démontre qu'environ 40% des protéines identifiées dans l'approche à 2 étapes ont été identifiées dans l'une ou l'autre des approches à 1 étape. Il est surprenant de constater que seulement 27 protéines de la purification à l'aide de Rad23 sont retrouvées dans l'approche à 2 étapes. Étant donné que la première étape est la même, une plus grande correspondance était attendue. Par contre, considérant le faible nombre de protéines identifiées comparativement aux milliers de protéines présentes dans la cellule, chaque analyse ne représente qu'une petite portion des protéines ubiquitinées.

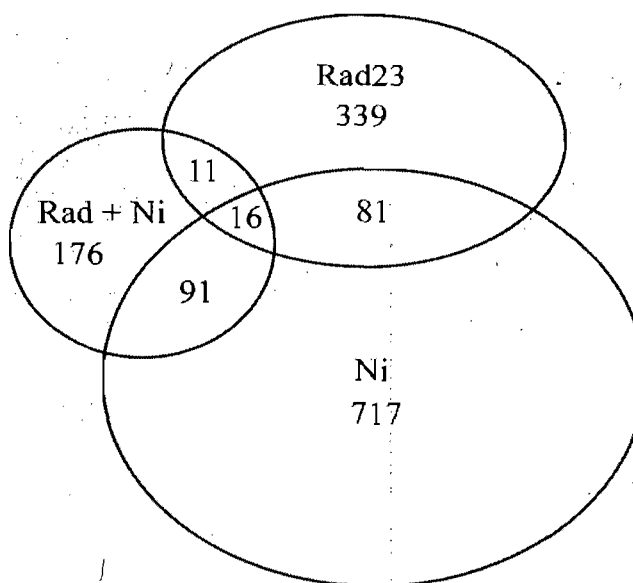


Figure 4.8 : Diagramme de Venn des identifications communes entre les différentes stratégies d'enrichissement.

4.3. Conclusion

De façon générale, les 2 approches de purification proposées à une étape permettent un survol de l'identité des protéines ubiquitinées dans la cellule. La stratégie de double enrichissement permet d'avoir une préparation d'échantillon beaucoup plus spécifique. Ainsi, la présence de protéines contaminantes est réduite considérablement par ces 2 purifications combinées comme cela a été démontré dans les sections précédentes. Entre autres, la probabilité d'identifier des protéines mono-ubiquitinées est très faible puisque Rad23 a une plus grande sélectivité pour les protéines polyubiquitinées. La limitation associée à cette approche est la nécessité de purifier une grande quantité de matériel afin d'obtenir un grand nombre d'identifications par MS. Malgré cette difficulté, l'approche à 2 étapes a permis l'identification de près de 300 protéines uniques potentiellement ubiquitinées. Environ 40% des protéines identifiées par le double enrichissement ont été détectées lors de l'une ou l'autre des approches à une étape.

De plus, 3 nouveaux sites d'ubiquitination ont été identifiés, soit la K83 de la sous-unité L15 de la protéine ribosomale 60S, la K59 de la protéine 1B de type choc thermique 70 kDa et la K61 de l'isoforme 5 de l'antigène mineur H13 histocompatible. La grande précision de masse permet d'augmenter le niveau de confiance des sites identifiés par MS/MS.

5. Validation de l'approche protéomique différentielle

5.1. Introduction

L'identification des protéines ubiquitinées a fait de réels progrès ces dernières années grâce à des techniques de purification efficaces et à des spectromètres de masse toujours plus performants tels que les instruments hybrides (Q-TOF, FTICR, LTQ-Orbitrap). L'identification des sites ubiquitinés est possible puisque, suite à la digestion trypsique, un adduit diglycine provenant de l'ubiquitine demeure sur la lysine modifiée. La stratégie pour identifier les sites d'ubiquitination consiste à rechercher cette augmentation de masse de 114,043 Da lors de l'assignation des spectres MS/MS par les algorithmes de recherche [4]. Il est aussi possible de rechercher un adduit -LRGG (383,228 Da) provenant d'un défaut de coupure de la trypsine sur l'ubiquitine elle-même [50]. Malgré cela, l'identification des sites précis d'ubiquitination demeure un défi bien actuel. Puisque cette méthode d'identification repose sur le séquençage complet de la protéine par MS/MS, la probabilité que le peptide portant la lysine modifiée soit séquencé est faible [48]. En effet, le pourcentage de couverture de séquence par MS/MS est faible, ce qui est suffisant pour identifier les protéines mais ne l'est pas pour une caractérisation complète [66]. De plus, on a pu constater au cours des chapitres précédents que le nombre de sites d'ubiquitination identifiés représente une très faible proportion de l'ensemble des identifications (typiquement < 1 %). Quelques stratégies pour augmenter le nombre d'identifications de sites d'ubiquitination ont donc été mises en place.

Outre la recherche de la modification par l'adduit diglycine, il est possible de modifier chimiquement l'extrémité N-terminale des peptides par une sulfonation. Les spectres MS/MS obtenus par MALDI-TOF ou ESI-TOF vont ainsi être composés d'une portion signature qui révèle les peptides porteurs d'un diglycine et d'une portion contenant les séries d'ions y qui permettent de séquencer le peptide et d'identifier le site d'ubiquitination [51], [52]. Cette réaction chimique devrait permettre d'identifier efficacement les protéines ubiquitinées et leurs sites de modification. Toutefois, cette approche n'a été validée qu'avec des peptides synthétiques. Il est aussi possible d'utiliser un appareil de haute résolution tel le FT-ICR ou des analyses MRM sur un

instrument triple quadrupôle pour détecter efficacement les sites d'ubiquitination [46], [53].

L'approche proposée ici est inspirée d'une étude précédente réalisée sur les phosphopeptides [96]. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle de grande importance dans la cellule. Malheureusement, la détection des phosphopeptides est limitée par la faible efficacité d'ionisation en mode positif causée par la contribution de la charge négative du groupement phosphate [113]. La méthode développée par quelques groupes de recherche, repose sur l'utilisation d'une enzyme de déphosphorylation, la phosphatase alcaline [114]. L'échantillon digéré enrichi en phosphopeptides est séparé en 2 parties dont une moitié est incubée avec cette enzyme de déphosphorylation. Les 2 échantillons sont ensuite analysés par MS et tous les peptides ayant une différence de masse de 80 Da sont désignés comme phosphopeptides potentiels [115]. La stratégie appliquée aux protéines ubiquitinées est donc de traiter une moitié de l'échantillon enrichi en protéines ubiquitinées avec le domaine catalytique de l'enzyme de déubiquitination USP2 (figure 5.1). Les deux échantillons sont ensuite analysés par nanoLC-MS et les données sont traitées à l'aide de différents outils bioinformatiques. Ainsi, les peptides dont une lysine portait l'adduit diglycine dans l'échantillon non traité, vont former 2 nouveaux peptides suite à la digestion trypsique une fois l'échantillon déubiquitiné. Le défi consiste donc à retracer ces 2 nouveaux peptides signatures d'un site d'ubiquitination parmi tous les peptides détectés. La mise au point de cette approche est discutée dans ce chapitre.

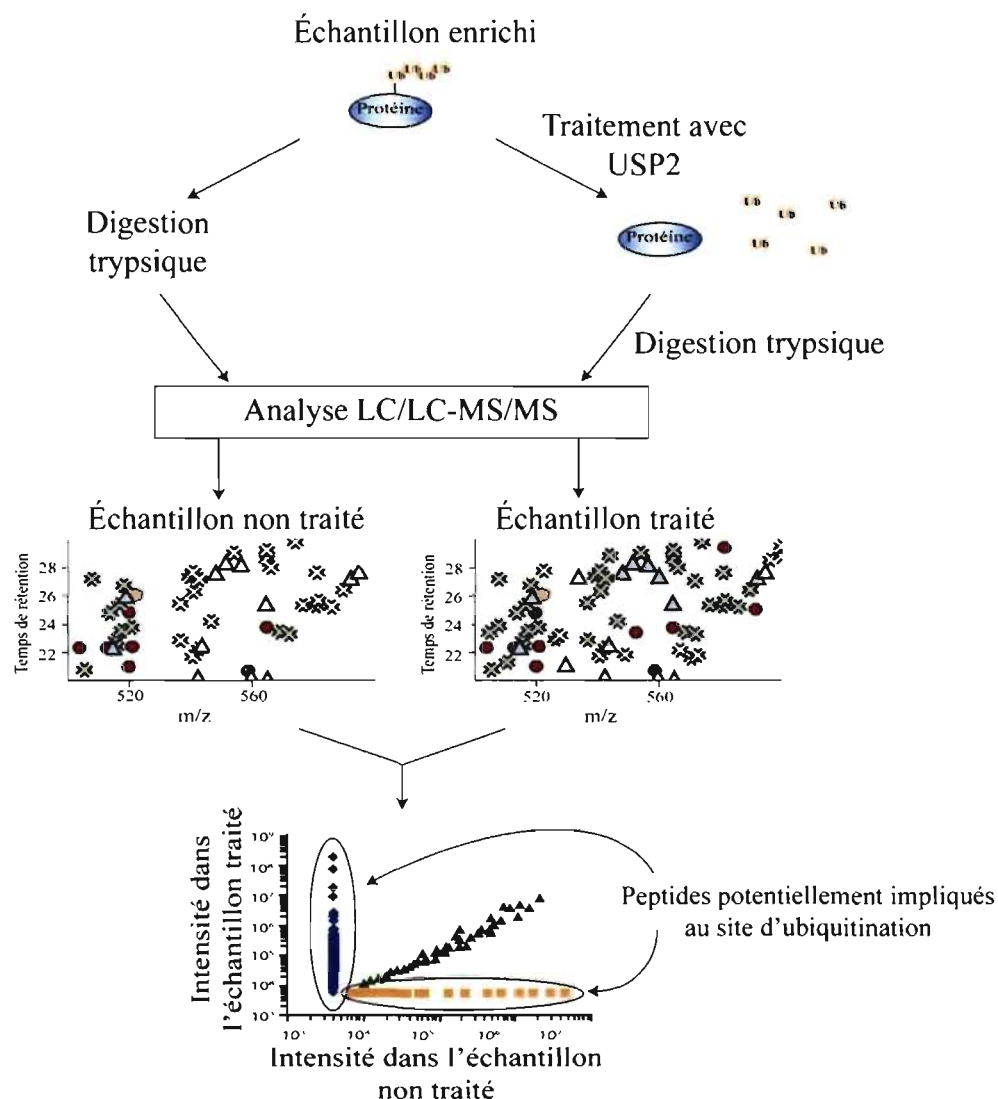


Figure 5.1: Schéma de l'approche protéomique différentielle proposée pour l'identification des sites d'ubiquitination.

5.2. Résultats et discussion

D'abord, l'échantillon enrichi est préparé selon l'approche basée sur l'affinité de liaison de Rad23 pour les protéines ubiquitinées. Ainsi, cette stratégie pourra être appliquée à une multitude de modèles biologiques sans la nécessité de recourir à la transfection. La digestion avec le domaine catalytique de l'enzyme de déubiquitination se fait dans le même tampon que la digestion trypsique. La procédure est donc très

simple et efficace tel que démontré à la figure 5.2. L'immunobuvardage anti-ubiquitine des échantillons démontre clairement la disparition complète du signal d'ubiquitination pour l'échantillon traité avec l'enzyme. De plus, sur le gel coloré à l'argent, une bande à environ 8 kDa apparaît pour l'échantillon digéré. Cette bande correspond aux monomères d'ubiquitine libérés sous l'action de l'enzyme. Des changements d'intensité de certaines bandes sont aussi visibles pour l'échantillon déubiquitiné.

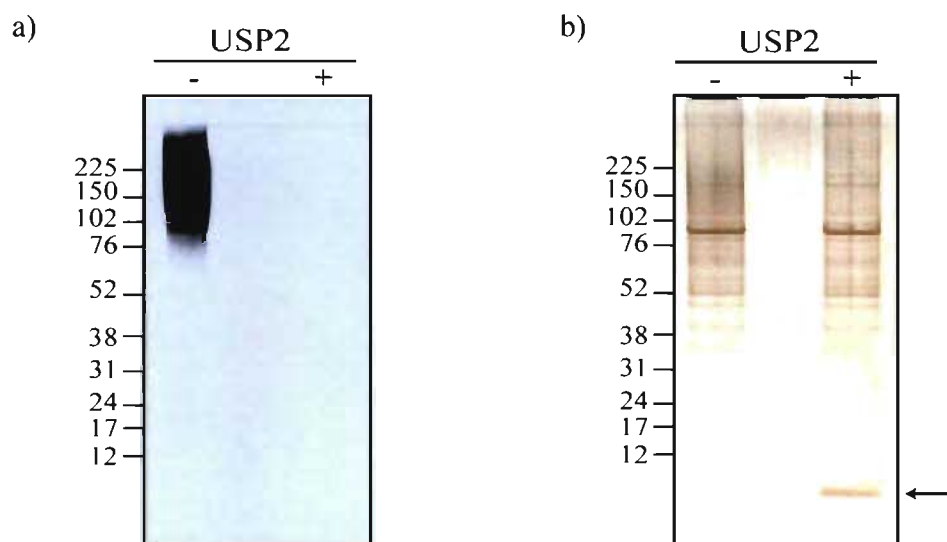


Figure 5.2: Déubiquitination des échantillons enrichis sur colonne d'affinité Rad23. a) Immunobuvardage anti-ubiquitine illustrant l'efficacité de digestion du domaine catalytique de l'enzyme de déubiquitination (USP2) des protéines ubiquitinées. Représente 2% des échantillons traités ou non. b) Gel coloré à l'argent des échantillons traités ou non (10%) avec USP2.

Les 2 échantillons sont ensuite fractionnés sur colonne SCX artisanale et analysés sur le LTQ-Orbitrap. Le traitement des données est ensuite effectué tel que décrit précédemment.

5.2.1. Analyse de l'échantillon non traité

Tout d'abord, l'analyse des spectres MS/MS de l'échantillon non traité avec le domaine catalytique de USP2 a permis l'identification de 4 nouveaux sites sur 4 protéines différentes (tableau 5.1 et figure 5.4). Un nouveau site d'ubiquitination a été identifié sur le cytochrome P450 CYP2J9, soit la lysine 152. Les cytochromes P450 sont une grande famille d'enzymes dont le rôle général est d'oxyder de nombreux composés chimiques dans la cellule et la plupart sont des protéines ancrées sur la membrane du réticulum endoplasmique par leur extrémité N-terminale [116]. Plus spécifiquement, la protéine CYP2J9 est impliquée dans l'oxydation de différents acides gras [117]. La famille des cytochromes P450 est connue pour être ubiquitinée. En effet, lors de la réaction enzymatique d'oxydation, des espèces réactives, telles que le O₂, sont générées et peuvent attaquer le domaine hème des cytochromes. L'enzyme est alors fonctionnellement ou structurellement endommagée et devient la cible pour la dégradation par le protéasome [116]. Par contre, aucun site d'ubiquitination sur la protéine CYP2J9 n'avait été reporté à ce jour.

Tableau 5.1 : Sites d'ubiquitination identifiés dans l'échantillon enrichi par la colonne d'affinité Rad23 et non traité par USP2.

Protéines	Peptides	Position	$\Delta m/z$ (ppm)
Cytochrome P450 CYP2J9	NFGLGK*R	K152	0,69
Désaturase 2 acétyl-coA	AEK*LVMFQR	K208	1,93
Kinase cycline-dépendante 1	WK*PGSLASHVK	K245	-9,84
Protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L	K*WEQSGAAEHYK	K170	-2,60

Ensuite, le deuxième site identifié est situé aussi sur une enzyme, soit la lysine 208 de la désaturase 2 acétyl-coA. Cette enzyme catalyse la biosynthèse d'acide gras mono-insaturés et est située à la membrane du réticulum endoplasmique [118]. Cette protéine est connue pour avoir une courte demi-vie, par contre, une étude rapporte un processus de dégradation possiblement autre que celui du protéasome [119]. En effet, il a été observé que le MG132 n'affecte pas la dégradation rapide d'un isoforme de cette

protéine chez les cellules HEK 293. Le site identifié ici sur l'isoforme 2 vient donc contredire cette étude. Des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer l'identification de ce site, par exemple, une immunoprécipitation de la forme naturelle et d'une forme de la protéine contenant une mutation en arginine de la K208 suivie d'un immunobuvardage anti-ubiquitine.

De plus, un site a été identifié sur une protéine essentielle pour le contrôle du cycle cellulaire, la lysine 245 de la kinase cycline-dépendante 1 (CDK1). Cette protéine est constamment présente tout au long du cycle cellulaire et son activité est régulée via des interactions protéine-protéine avec plusieurs protéines, entre autres des cyclines, et via des phosphorylations réversibles [120]. Cette kinase influence l'entrée en mitose de la cellule, c'est-à-dire la phase de division cellulaire et ses partenaires d'interaction sont les cyclines A et B. Il est connu que les cyclines sont dégradées via le protéasome une fois ubiquitinées, par contre, l'ubiquitination d'une kinase cycline-dépendante n'a pas été reportée à ce jour [121]. Selon la structure tridimensionnelle de cette protéine, la K245 est située sur une boucle facilement accessible pour les enzymes d'ubiquitination (figure 5.3). Cette localisation concorde avec l'étude bio-informatique reportant une préférence des sites d'ubiquitination sur des boucles et des hélices exposées à la surface [100].

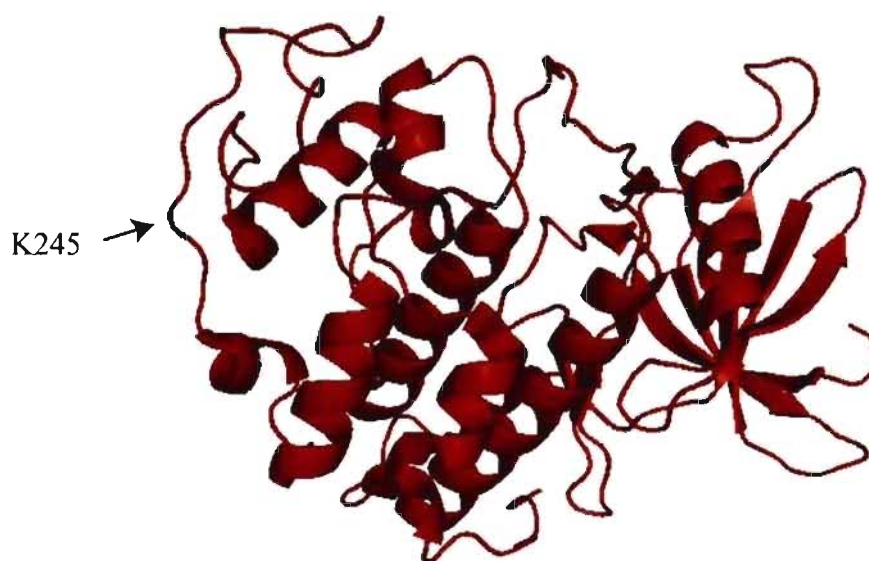


Figure 5.3: Structure tridimensionnelle de la kinase cycline-dépendante 1
(Source : Protein Data Bank, code 1LC9).

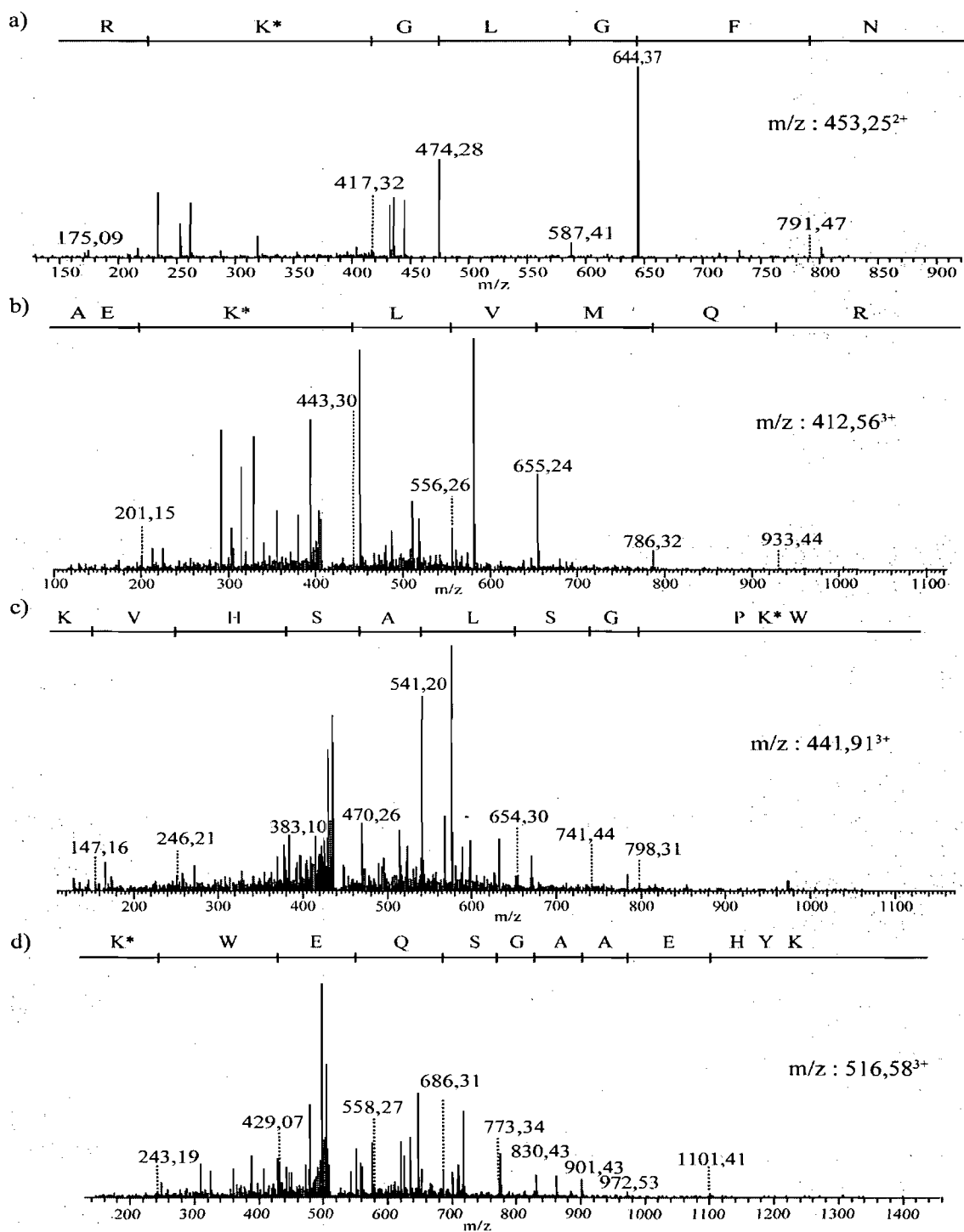


Figure 5.4 : Spectre MS/MS des peptides identifiés avec la lysine (K*) portant l'adduit diglycine. a) Cytochrome P450 CYP2J9 (série d'ions y) b) Désaturase 2 acétyl-coA (séries d'ions b). c) CDK1 (série d'ions y). d) Protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L (série d'ions b).

Enfin, la K170 de la protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L a aussi été identifiée comme site d'ubiquitination. Cette protéine est impliquée au niveau de la présentation des antigènes au système immunitaire [122]. La lysine identifiée est située sur une hélice alpha exposée à la surface de la protéine (figure 5.9). Ce site est donc favorable à l'ubiquitination.

5.2.2. Analyse de l'échantillon traité

En vue d'augmenter l'identification de sites d'ubiquitination, l'analyse différentielle proposée consiste à comparer les analyses MS/MS d'un échantillon ubiquitiné à celles d'un échantillon déubiquitiné suite à un traitement à l'USP2. Pour ce faire, le logiciel MassSense est utilisé pour corréler les séquences peptidiques avec les valeurs de m/z , de temps de rétention et d'intensité et ainsi tracer une distribution d'intensité des groupes de peptides dans les 2 échantillons (figure 5.5 et tableau 5.2).

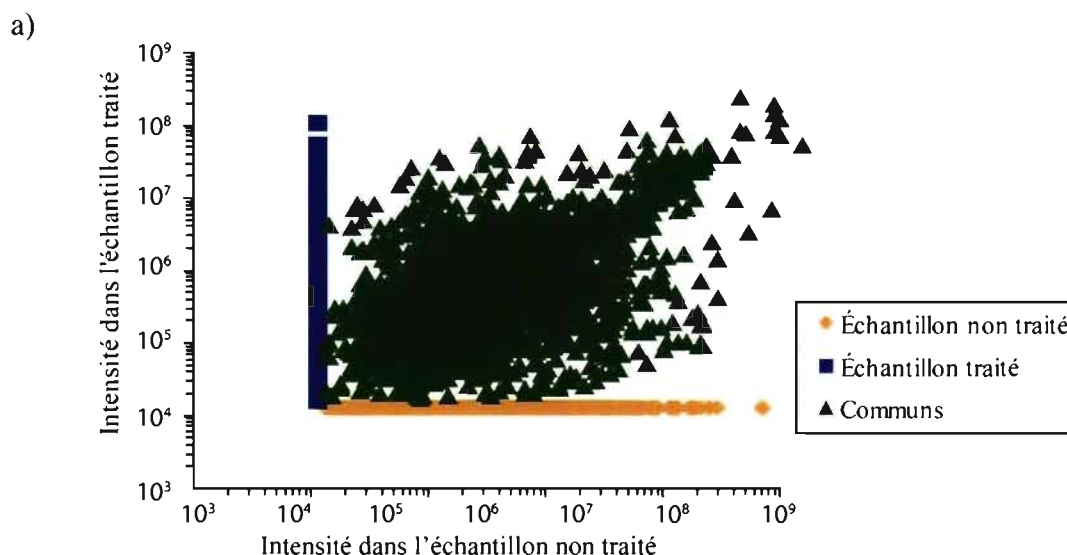


Figure 5.5 : Regroupement similaire des peptides à travers les échantillons.

a) Distribution d'intensité des groupes de peptides selon leur identification dans les échantillons digérés ou non avec le domaine catalytique de USP2.

Tableau 5.2 : Tableau récapitulatif représentant le nombre de groupes de peptides uniques pour les 2 échantillons et communs.

	Groupes de peptides	%
Échantillon non traité	3231	42,3
Échantillon traité	2036	26,6
Commun	2374	31,1
Total	7641	

Selon cette distribution, il y a 2374 groupes de peptides (31,1%) communs entre les échantillons. Ces peptides représentent donc possiblement des peptides qui ne sont pas directement ubiquitinés ou qui correspondent à des protéines contaminantes présentes dans les 2 échantillons. L'échantillon non traité compte 3231 groupes de peptides uniques (42,3%) alors que l'échantillon traité en compte 2036 (26,6%). Ainsi, il y a environ 10% de plus de peptides détectés lorsque l'adduit diglycine est présent sur les lysines ubiquitinées. Le contraire était pourtant attendu puisque la trypsine est en mesure de couper au site d'ubiquitination une fois l'échantillon déubiquitiné. Il devrait donc y avoir 2 nouveaux peptides uniques à l'échantillon traité comparativement à un peptide unique à l'échantillon non traité. L'immunobuvardage anti-ubiquitine, présenté à la figure 5.2, démontre que la déubiquitination est complète puisqu'il n'y a aucun signal détecté. En effet, l'anticorps utilisé permet de détecter les formes mono- ou polyubiquitinées sans se lier sur la forme libre. Ainsi, ce nombre plus élevé de peptides pour l'échantillon non traité ne peut s'expliquer par une déubiquitination incomplète.

Pour un mélange de cette complexité il est difficile d'interpréter ces résultats puisque plusieurs hypothèses sont envisageables. Par exemple, il est courant d'observer une protéine qui soit multi-ubiquitinée [9]. Ainsi, il est possible qu'une telle protéine existe dans la cellule sous différents états d'ubiquitination, tel qu'illustré à la figure 5.6. Suite à la digestion trypsique, les peptides des sites A et B seront uniques à l'échantillon non traité, par contre, les 2 peptides de la forme non-ubiquitinée ou déubiquitinée du site B seront communs entre les 2 échantillons. Il y aura donc seulement 2 nouveaux peptides dans l'échantillon traité alors que 4 peptides étaient attendus puisqu'il y a 2

sites d'ubiquitination. Ce cas ne contribue donc pas au nombre de peptides présents uniquement dans l'échantillon déubiquitiné.

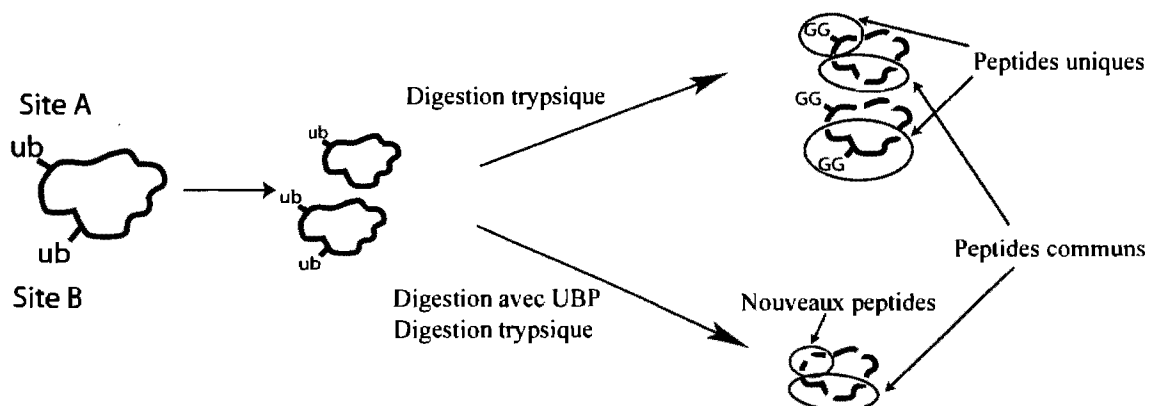


Figure 5.6 : Schéma illustrant le cas d'une protéine multi-ubiquitinée existant sous 2 états différents d'ubiquitination dans la cellule.

Un autre cas possible provient de la différence de détection du spectromètre de masse pour des peptides ayant des caractéristiques différentes. En effet, il est connu que les peptides n'ionisent pas tous avec la même facilité ou peuvent fragmenter d'une façon atypique ce qui rend difficile leur détection ou leur séquençage [67]. Ainsi un peptide détecté sous forme ubiquitinée va produire, suite à la déubiquitination, 2 peptides de plus petite taille ou avec des caractéristiques différentes qui ne seront peut-être pas détectés. Inversement, un peptide sous forme ubiquitinée ne sera pas détecté à cause d'une taille trop grande alors que les peptides correspondants seront détectés dans l'échantillon déubiquitiné.

Une analyse plus en profondeur était donc nécessaire pour évaluer l'efficacité de l'approche. Un algorithme de recherche a été développé selon le schéma présenté à la figure 5.7. En considérant que les peptides uniques à l'échantillon traité avec l'enzyme de déubiquitination proviennent d'un peptide initialement ubiquitiné coupé en deux par la trypsine, l'hypothèse de départ est que les 2 portions du peptide précédemment ubiquitiné ont été détectées. La stratégie de validation consiste donc à retrouver les 2 peptides formant le peptide donné portant l'adduit diglycine dans l'échantillon non traité. Pour chaque peptide unique à l'échantillon déubiquitiné, l'algorithme retrace la séquence de la protéine associée, cherche le premier peptide trypsique situé en aval et en

amont et vérifie s'ils ont été séquencés dans l'un ou l'autre des échantillons. Encore une fois, plusieurs cas sont possibles. D'abord, si l'acide aminé en N-terminal du peptide en aval du peptide étudié est une arginine, il est impossible que ce soit un site d'ubiquitination. La probabilité que le site d'ubiquitination se situe entre ces 2 peptides est donc nulle. Néanmoins, si cet acide aminé est une lysine, le site est possible et le premier peptide tryptique en amont est recherché parmi les spectres enregistrés. Pour être considéré comme site potentiel d'ubiquitination, le peptide recherché doit être détecté uniquement dans l'échantillon traité. Ensuite, de la même façon, si l'acide aminé en C-terminal du peptide étudié est une arginine, la possibilité d'un site d'ubiquitination sur ce peptide est nulle. Par contre, si cet acide aminé est une lysine, le premier peptide tryptique rencontré en aval de la séquence est recherché. Il est aussi possible que les peptides en amont ou en aval des peptides détectés soient de moins de 6 acides aminés ou de plus 30 acides aminés. Dans ce cas, les caractéristiques du LTQ-Orbitrap ne vont pas permettre de détecter ces peptides. En effet, le balayage de rapport m/z se fait de 400 à 1600 Da, c'est pourquoi des peptides doublement ou triplement chargés de moins de 6 acides aminés ou de plus de 30 acides aminés ne seront pas analysés. Toutes ces possibilités réduisent le nombre de peptides potentiellement impliqués au niveau du site d'ubiquitination. Les statistiques complètes sont présentées à la figure 5.8.

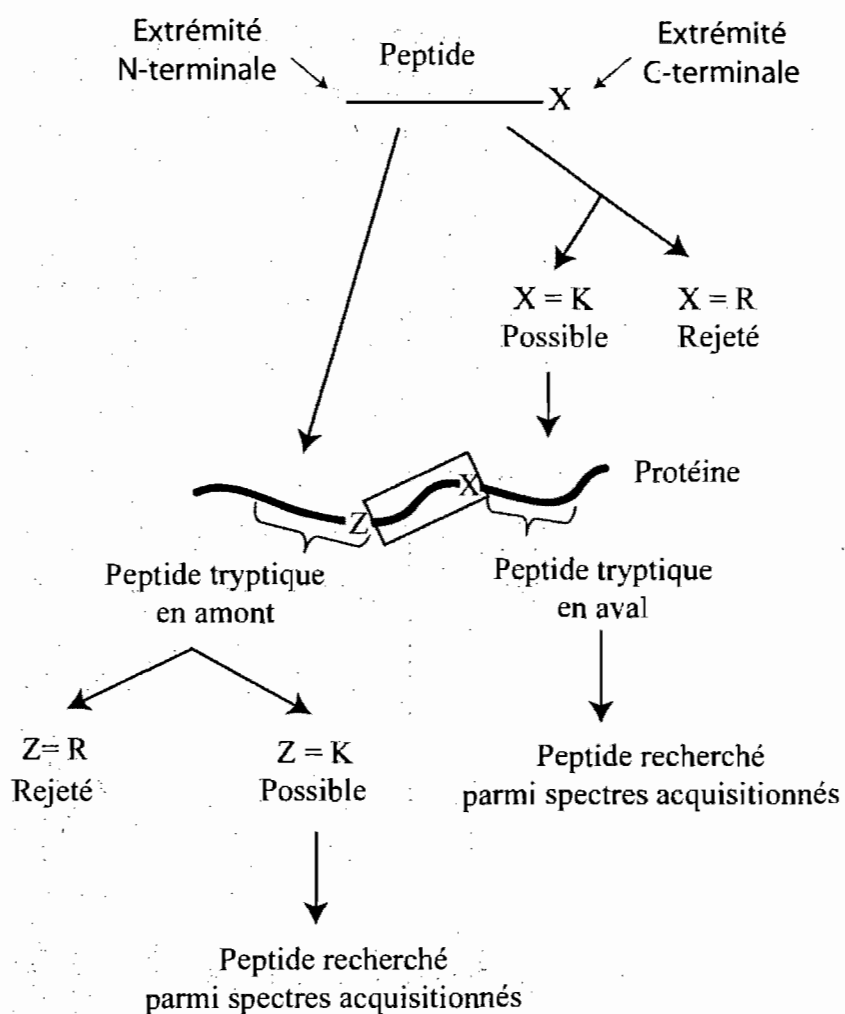


Figure 5.7 : Schéma des étapes suivies par l'algorithme de recherche.

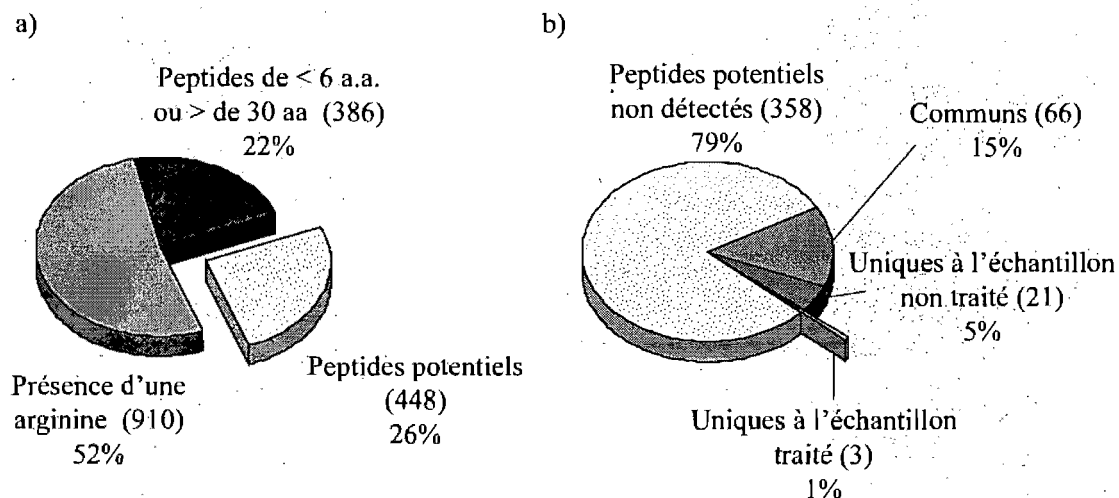


Figure 5.8 : Diagrammes circulaires illustrant les statistiques d'identifications des peptides recherchés. a) Diagramme circulaire classant tous les peptides recherchés dans 3 catégories dépendamment de la présence d'une arginine au site potentiel d'ubiquitination, que le peptide possède moins de 6 acides aminés ou plus de 30 et que les peptides proviennent d'un site potentiel d'ubiquitination. **b)** Diagramme circulaire des peptides potentiels divisés selon 4 catégories : les peptides recherchés sont présents dans les 2 échantillons ou uniques à l'un ou l'autre des échantillons et tous les autres peptides potentiels n'ayant pas été identifiés.

L'analyse des résultats obtenus permet de déterminer que dans 52% des cas, la présence d'un site d'ubiquitination est impossible à cause de la présence d'une arginine à la jonction des 2 peptides. De plus, près du quart des peptides en amont ou en aval ont peu de chances d'être détectés car ils ont moins de 6 ou plus de 30 acides aminés (22,1%). Ainsi, seulement 26% des peptides séquencés uniquement dans l'échantillon débubiquitiné sont potentiellement porteurs d'un site d'ubiquitination. En considérant seulement ces peptides potentiels, 5% des peptides en amont ou en aval sont présents uniquement dans l'échantillon non traité. Ces peptides sont considérés comme des faux positifs possiblement causés par des défauts de coupure de la trypsine ou par la nature stochastique de l'acquisition MS/MS. Ensuite, 15% des peptides sont présents dans les 2 échantillons. Pour ces peptides, il est impossible de déterminer s'ils sont réellement

impliqués au niveau du site d'ubiquitination. L'algorithme de recherche a été en mesure de reformer 3 couples de peptides parmi les peptides potentiels ce qui représente 1% des possibilités. Toutefois, en considérant que la trypsine ait été en mesure de cliver au niveau de la lysine modifiée, un peptide ubiquitiné non détecté dans l'échantillon non traité aura peu de chances d'être détecté une fois déubiquitiné et ne pourra être retracé par l'algorithme de recherche. Ainsi, une portion inconnue des peptides potentiels est exclue de nos analyses ce qui pourrait expliquer en partie que près de 80% ne sont pas identifiés selon l'algorithme de recherche mis au point.

Ces 3 nouveaux sites potentiels d'ubiquitination représentent tout de même presque le nombre de sites identifiés avec l'approche courante puisque l'analyse MS/MS de l'échantillon non traité a permis d'identifier 4 peptides avec l'adduit diglycine. Les couples de peptides retracés sont présentés au tableau 5.3.

Tableau 5.3: Identification des couples de peptides retracés par l'algorithme de recherche.

Protéine	Peptide étudié	Peptide retracé	Site potentiel d'ubiquitination
Protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L	WEQSGAAEHYK*	AYLEGECEVWLHR	K181
Hélicase d'ARN ATP-dépendante DDX5	WNLDELPKFEK*	NFYQEHPDLAR	K56
6-Phospho-fructokinase	TGISEGHTVYIVHDG FEGLAK*	GQVQEVGWHDVAGW LGR	K444

Il est intéressant de constater qu'un deuxième site potentiel d'ubiquitination a été identifié sur la protéine provenant du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L. En effet, l'analyse de l'échantillon non digéré par l'enzyme de déubiquitination avait permis d'identifier la K170. L'approche différentielle proposée permet d'identifier la K181 comme site d'ubiquitination potentiel. Tout comme la

K170, cette lysine est située sur une hélice alpha exposée à la surface de la protéine, tel qu'illustré à la figure 5.9.

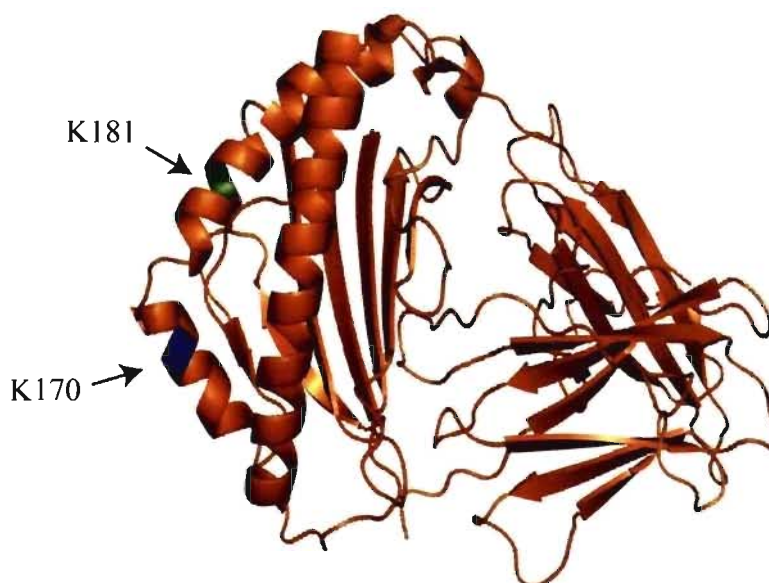


Figure 5.9 : Structure tridimensionnelle de la protéine provenant du gène complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de type H2-L (Source : Protein Data Bank, code 1BZ9).

Le deuxième site potentiel identifié est la lysine 56 de la protéine hélicase d'ARN ATP-dépendante DDX5. Comme son nom l'indique, cette protéine sépare les doubles brins d'ADN à l'aide d'ATP. Les hélices d'ARN sont moins courantes que celles d'ADN toutefois, elles sont retrouvées chez les virus, dans une structure locale secondaire et sur l'ARN messager avant l'épissage [123]. Le dernier couple de peptides appartient à la 6-phosphofructokinase et la lysine potentiellement ubiquitinée est la K444. Cette enzyme est bifonctionnelle, c'est-à-dire qu'elle catalyse la synthèse tout comme la dégradation du fructose 2,6-biphosphate [124]. Lors d'une étude chez des cellules murines de myoblastes dans un stade de différenciation, des chercheurs ont détecté une forme polyubiquitinée de cette protéine suite à l'inhibition du protéasome par le MG132. Le site d'ubiquitination n'a toutefois pas été identifié. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer l'ubiquitination de cette protéine.

5.3. Conclusion

L'approche différentielle proposée visait à faciliter l'identification de sites d'ubiquitination. Elle consiste à comparer les analyses par spectrométrie de masse d'un échantillon enrichi en protéines ubiquitinées par l'approche basée sur Rad23 dont une moitié est traitée avec une enzyme de déubiquitination. Ainsi, les peptides porteurs de l'adduit diglycine sur une lysine, signature d'un site d'ubiquitination, seront présents uniquement dans l'échantillon non traité alors qu'il devrait y avoir 2 nouveaux peptides détectés une fois l'échantillon déubiquitiné. En effet, la trypsine est incapable de cliver le lien à l'extrémité C-terminale d'une lysine modifiée. Une analyse poussée des résultats a permis d'identifier 3 sites potentiels d'ubiquitination à l'aide de cette stratégie différentielle. Ces sites ont été sélectionnés puisque leurs peptides associés n'ont été détectés que dans l'échantillon traité avec l'enzyme de déubiquitination. Puisque l'analyse de l'échantillon ubiquitiné a aussi permis d'identifier 4 sites d'ubiquitination, l'approche protéomique différentielle conduit à une plus grande identification. Cette approche est donc prometteuse mais nécessite de nouvelles analyses. En effet, la contribution réelle des défauts de coupure de la trypsine dans les conditions expérimentales demeure inconnue. Les analyses devraient être faites simultanément avec un contrôle négatif, c'est-à-dire un échantillon non enrichi en protéines ubiquitinées traité ou non avec l'enzyme de déubiquitination.

Les analyses ont donc permis d'identifier plusieurs sites potentiels d'ubiquitination sur des protéines connues pour subir une dégradation sous la régulation de l'ubiquitine, par exemple, la lysine 152 du cytochrome P450 CYP2J9 et la lysine 444 de la 6-phosphofructokinase.

6. Conclusion générale

Dans le contexte des études protéomiques à grande échelle, l'objectif général de ce projet était de mettre au point une approche protéomique différentielle originale pour améliorer l'identification des protéines ubiquitinées et de leur site d'ubiquitination. Le premier objectif consistait à mettre au point une méthode de purification des protéines ubiquitinées. Deux approches de purification ainsi qu'une combinaison des deux ont été évaluées. D'abord, l'efficacité de liaison de 3 protéines possédant un domaine liant l'ubiquitine a été évaluée soit Rad23, Dsk2 et Rpn10. Rad23 a été sélectionné pour la suite des analyses puisqu'il possédait la meilleure capacité d'enrichissement des protéines ubiquitinées. La grande complexité de l'échantillon obtenu a nécessité un fractionnement sur une colonne SCX artisanale en mode discontinu avant l'analyse par nanoLC-MS/MS sur un LTQ-Orbitrap. Ces analyses ont conduit à l'identification de 448 protéines uniques potentiellement ubiquitinées présentes seulement dans l'échantillon enrichi par Rad23.

La deuxième approche consistait à transfecter les cellules avec une forme 6xHis-ubiquitine suivie d'une purification sur une colonne de billes de Ni-NTA. Cette méthode enrichit les protéines ubiquitinées sans être sélective vis-à-vis les protéines mono-ubiquitinées ou polyubiquitinées, contrairement à Rad23 qui possède une affinité plus grande pour les protéines liées à une chaîne d'ubiquitine d'au moins 4 unités. Cette stratégie a permis d'identifier 905 protéines uniques potentiellement ubiquitinées par nanoLC/LC-MS/MS.

La combinaison de ces 2 méthodes conduit à une méthode possédant les avantages de chacune. Ainsi, la colonne de Rad23 sélectionne d'abord les protéines polyubiquitinées alors que la purification sur colonne de Ni-NTA, réalisée sous conditions dénaturantes, permet de limiter la présence de protéines contaminantes. Toutefois, cette approche nécessite une grande quantité de matériel et l'analyse par spectrométrie de masse d'un tel échantillon a conduit à l'identification de 294 protéines uniques potentiellement ubiquitinées.

L'approche différentielle protéomique proposée consistait d'abord à enrichir l'échantillon en protéines ubiquitinées à l'aide de la purification basée sur Rad23 et ensuite à traiter une seule moitié de cet échantillon avec une enzyme de déubiquitination suivi d'une analyse par nanoLC/LC-MS/MS des deux échantillons. L'approche différentielle a été développée à partir d'un échantillon préparé à l'aide de Rad23 puisque cette méthode ne nécessite aucune transfection et peut donc être appliquée à de multiples échantillons biologiques.

L'identification des sites d'ubiquitination se fait habituellement en recherchant la présence de l'adduit diglycine résultant d'un défaut de coupure de la trypsine sur la lysine modifiée par l'ubiquitine. Plusieurs sites ont d'ailleurs été identifiés à l'aide de cette méthode, lors de la mise au point des approches de purification. La stratégie différentielle développée consiste à comparer les 2 populations peptidiques afin d'identifier les peptides uniques à chaque échantillon. Ces peptides sont potentiellement impliqués au niveau de l'ubiquitination. Leur identification se fait grâce au logiciel MassSense et un algorithme de recherche permet ensuite de reformer les couples de peptides, uniques à l'échantillon déubiquitiné, formés par le clivage de la trypsine à la lysine déubiquitinée.

L'analyse de l'échantillon non traité a d'abord permis d'identifier 4 sites d'ubiquitination sur des peptides portant l'adduit diglycine. Ensuite, l'analyse poussée des données de l'échantillon traité a permis d'identifier 3 sites potentiels d'ubiquitination. L'approche différentielle proposée se révèle donc efficace puisqu'elle permet de presque doubler le nombre d'identification. Toutefois, des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer la reproductibilité de l'approche et le taux de faux positifs.

Pour conclure, des approches d'enrichissement en protéines ubiquitinées ont été développées avec succès. De plus, l'approche protéomique différentielle proposée permettant d'augmenter l'identification de sites d'ubiquitination a été évaluée et elle se révèle prometteuse. Toutefois, un des défis des analyses de protéines ubiquitinées est d'identifier des protéines importantes pour la cellule et connues pour être faiblement abondantes. Malgré un grand nombre d'identifications à travers les différentes analyses, aucune protéine de ce type n'a été identifiée. Ce défi demeure donc d'actualité.

7. Références

1. Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
2. Wong, B. R., Parlati, F., Qu, K., Demo, S., Pray, T., Huang, J., Payan, D. G., and Bennett, M. K. (2003) Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway. *Drug Discov Today* 8, 746-754.
3. Petroski, M. D. (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem* 9 Suppl 1, S7.
4. Peng, J. (2008) Evaluation of proteomic strategies for analyzing ubiquitinated proteins. *BMB Rep* 41, 177-183.
5. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
6. Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
7. Pickart, C. M., and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-616.
8. Haglund, K., and Dikic, I. (2005) Ubiquitylation and cell signaling. *Embo J* 24, 3353-3359.
9. Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921-926.
10. Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007) The Ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div* 2, 11.
11. Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94-102.
12. Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2007) Certain E2-E3 pairs synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem*.
13. Hicke, L., Schubert, H. L., and Hill, C. P. (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-621.
14. Weissman, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

15. Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 369-381.
16. Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.
17. Wing, S. S. (2003) Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 590-605.
18. Sloper-Mould, K. E., Jemc, J. C., Pickart, C. M., and Hicke, L. (2001) Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J Biol Chem* 276, 30483-30489.
19. Hurley, J. H., Lee, S., and Prag, G. (2006) Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 399, 361-372.
20. Rao, H., and Sastry, A. (2002) Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. *J Biol Chem* 277, 11691-11695.
21. Raasi, S., Varadan, R., Fushman, D., and Pickart, C. M. (2005) Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol* 12, 708-714.
22. Raasi, S., Orlov, I., Fleming, K. G., and Pickart, C. M. (2004) Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol* 341, 1367-1379.
23. Glickman, M. H., and Raveh, D. (2005) Proteasome plasticity. *FEBS Lett* 579, 3214-3223.
24. Deveraux, Q., Ustreli, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994) A 26 S Protease Subunit That Binds Ubiquitin Conjugates*. *The journal of Biological Chemistry* 269, 7059-7061.
25. Hartmann-Petersen, R., and Gordon, C. (2004) Protein degradation: recognition of ubiquitinated substrates. *Curr Biol* 14, R754-756.
26. Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8, 397-403.
27. Ventadour, S., Jarzaguet, M., Wing, S. S., Chambon, C., Combaret, L., Bechet, D., Attaix, D., and Taillandier, D. (2006) A new method of purification of proteasome substrates reveals polyubiquitination of 20S proteasome subunits. *J Biol Chem*.

28. Mayor, T., Lipford, J. R., Graumann, J., Smith, G. T., and Deshaies, R. J. (2005) Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets. *Mol Cell Proteomics* 4, 741-751.
29. Tomlinson, E., Palaniyappan, N., Tooth, D., and Layfield, R. (2007) Methods for the purification of ubiquitinated Proteins. *Proteomics*.
30. Beers, E. P., and Callis, J. (1993) Utility of polyhistidine-tagged ubiquitin in the purification of ubiquitin-protein conjugates and as an affinity ligand for the purification of ubiquitin-specific hydrolases. *J Biol Chem* 268, 21645-21649.
31. Freshney, R. I. (2005) *Culture of Animal Cells*, 5 Ed., John Wiley and Sons, Hoboken.
32. Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., and Kaiser, P. (2006) A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics* 5, 737-748.
33. Ota, K., Kito, K., Iemura, S. I., Natsume, T., and Ito, T. (2008) A parallel affinity purification method for selective isolation of polyubiquitinated proteins. *Proteomics*.
34. Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523-533.
35. Jeon, H. B., Choi, E. S., Yoon, J. H., Hwang, J. H., Chang, J. W., Lee, E. K., Choi, H. W., Park, Z. Y., and Yoo, Y. J. (2007) A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*.
36. Ellison, M. J., and Hochstrasser, M. (1991) Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function. *J Biol Chem* 266, 21150-21157.
37. Kirkpatrick, D. S., Denison, C., and Gygi, S. P. (2005) Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol* 7, 750-757.
38. Vasilescu, J., Smith, J. C., Ethier, M., and Figeys, D. (2005) Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* 4, 2192-2200.

39. Matsumoto, M., Hatakeyama, S., Oyamada, K., Oda, Y., Nishimura, T., and Nakayama, K. I. (2005) Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics* 5, 4145-4151.
40. Layfield, R., Tooth, D., Landon, M., Dawson, S., Mayer, J., and Alban, A. (2001) Purification of poly-ubiquitinated proteins by S5a-affinity chromatography. *Proteomics* 1, 773-777.
41. Maor, R., Jones, A., Nuhse, T. S., Studholme, D. J., Peck, S. C., and Shirasu, K. (2007) MudPIT analysis of ubiquitinated proteins in plants. *Mol Cell Proteomics*.
42. Mikkelsen, S. R., and Corton, E. (2004) *Bioanalytical Chemistry*, Wiley Interscience, Hoboken.
43. Graumann, J., Dunipace, L. A., Seol, J. H., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Wold, B. J., and Deshaies, R. J. (2004) Applicability of tandem affinity purification MudPIT to pathway proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics* 3, 226-237.
44. Roe, M. R., and Griffin, T. J. (2006) Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics* 6, 4678-4687.
45. Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J., and Gygi, S. P. (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J Proteome Res* 2, 43-50.
46. Cooper, H. J., Heath, J. K., Jaffray, E., Hay, R. T., Lam, T. T., and Marshall, A. G. (2004) Identification of sites of ubiquitination in proteins: a fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry approach. *Anal Chem* 76, 6982-6988.
47. Galluzzi, L., Paiardini, M., Lecomte, M. C., and Magnani, M. (2001) Identification of the main ubiquitination site in human erythroid alpha-spectrin. *FEBS Lett* 489, 254-258.
48. Seyfried, N. T., Xu, P., Duong, D. M., Cheng, D., Hanfelt, J., and Peng, J. (2008) Systematic Approach for Validating the Ubiquitinated Proteome. *Anal Chem*.
49. Denison, C., Kirkpatrick, D. S., and Gygi, S. P. (2005) Proteomic insights into ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Curr Opin Chem Biol* 9, 69-75.
50. Denis, N. J., Vasilescu, J., Lambert, J. P., Smith, J. C., and Figeys, D. (2007) Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry. *Proteomics* 7, 868-874.

51. Wang, D., and Cotter, R. J. (2005) Approach for determining protein ubiquitination sites by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 77, 1458-1466.
52. Wang, D., Kalume, D., Pickart, C., Pandey, A., and Cotter, R. J. (2006) Identification of protein ubiquitylation by electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of sulfonated tryptic peptides. *Anal Chem* 78, 3681-3687.
53. Mollah, S., Wertz, I. E., Phung, Q., Arnott, D., Dixit, V. M., and Lill, J. R. (2007) Targeted mass spectrometric strategy for global mapping of ubiquitination on proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21, 3357-3364.
54. Gross, J. H. (2004) *Mass Spectrometry*, Springer, Berlin.
55. Aebersold, R., and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
56. Hoffmann, E. d., and Stroobant, V. (2005) *Spectrométrie de masse* 3^e Ed., Dunod, Paris.
57. Olsen, J. V., Ong, S. E., and Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608-614.
58. Haas, W., Faherty, B. K., Gerber, S. A., Elias, J. E., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Li, X., Villen, J., and Gygi, S. P. (2006) Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 5, 1326-1337.
59. Wilm, M., and Mann, M. (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 68, 1-8.
60. Cech, N. B., and Enke, C. G. (2001) Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev* 20, 362-387.
61. Kebarle, P., and Tang, L. (1993) From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical chemistry* 65, 972-986.
62. Scigelova, M., and Makarov, A. (2006) Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16-21.
63. Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., and Horning, S. (2006) Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 78, 2113-2120.
64. Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., and Graham Cooks, R. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40, 430-443.

65. Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., and Horning, S. (2006) Dynamic range of mass accuracy in LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* 17, 977-982.
66. Steen, H., and Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699-711.
67. Nesvizhskii, A. I., and Aebersold, R. (2005) Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. *Mol Cell Proteomics* 4, 1419-1440.
68. Huttlin, E. L., Hegeman, A. D., Harms, A. C., and Sussman, M. R. (2007) Prediction of error associated with false-positive rate determination for peptide identification in large-scale proteomics experiments using a combined reverse and forward peptide sequence database strategy. *J Proteome Res* 6, 392-398.
69. Vasilescu, J., Smith, J. C., Zweitzig, D. R., Denis, N. J., Haines, D. S., and Figeys, D. (2008) Systematic determination of ion score cutoffs based on calculated false positive rates: application for identifying ubiquitinated proteins by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 43, 296-304.
70. Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinisky, J. R., Resing, K. A., and Ahn, N. G. (2005) Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4, 1487-1502.
71. Jaitly, G., Bonneil, E., Jaitly, N., Eng, K., Pomiès, C., and Thibault, P. (2008) Comprehensive profiling of label-free peptide ions from large-scale proteomics experiments using one and two dimensional nanoLC-MS/MS. *Submitted*.
72. Westermeier, R., and Marouga, R. (2005) Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* 25, 19-32.
73. Xu, P., and Peng, J. (2006) Dissecting the ubiquitin pathway by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1940-1947.
74. Mayor, T., and Deshaies, R. J. (2005) Two-Step Affinity Purification of Multiubiquitylated Proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 399, 385-392.
75. Marotti, L. A., Jr., Newitt, R., Wang, Y., Aebersold, R., and Dohlman, H. G. (2002) Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* 41, 5067-5074.
76. Kirkpatrick, D. S., Weldon, S. F., Tsaprailis, G., Liebler, D. C., and Gandolfi, A. J. (2005) Proteomic identification of ubiquitinated proteins from human cells expressing His-tagged ubiquitin. *Proteomics* 5, 2104-2111.

77. Gururaja, T., Li, W., Noble, W. S., Payan, D. G., and Anderson, D. C. (2003) Multiple functional categories of proteins identified in an in vitro cellular ubiquitin affinity extract using shotgun peptide sequencing. *J Proteome Res* 2, 394-404.
78. Bauer, A., and Kuster, B. (2003) Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* 270, 570-578.
79. Chen, L., Shinde, U., Ortolan, T. G., and Madura, K. (2001) Ubiquitin-associated (UBA) domains in Rad23 bind ubiquitin and promote inhibition of multi-ubiquitin chain assembly. *EMBO Rep* 2, 933-938.
80. Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004) Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279, 26817-26822.
81. Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R. J. (2004) Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.
82. Wilkinson, C. R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., and Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3, 939-943.
83. Thomas, P., and Smart, T. G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51, 187-200.
84. Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1996) Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 27280-27284.
85. Fujimuro, M., Sawada, H., and Yokosawa, H. (1994) Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett* 349, 173-180.
86. Berkers, C. R., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebiger, E., Kessler, B. M., Anderson, K. C., Ploegh, H. L., Ova, H., and Galaray, P. J. (2005) Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods* 2, 357-362.
87. Voorhees, P. M., and Orlowski, R. Z. (2006) The proteasome and proteasome inhibitors in cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 189-213.
88. Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S. (2003) Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome

pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 4542-4558.

89. Tsumoto, K., Ejima, D., Senczuk, A. M., Kita, Y., and Arakawa, T. (2007) Effects of salts on protein-surface interactions: applications for column chromatography. *J Pharm Sci* 96, 1677-1690.
90. Laboratories, B. (2000) Activated Immunoaffinity Supports.
91. Forest, A. (2006) Évaluation de différentes composantes chromatographiques d'un système nano-LC-MS pour des applications protéomiques. *Chimie*, Université de Montréal, Montréal.
92. Chen, G. I., and Gingras, A. C. (2007) Affinity-purification mass spectrometry (AP-MS) of serine/threonine phosphatases. *Methods* 42, 298-305.
93. Borodovsky, A., Kessler, B. M., Casagrande, R., Overkleeft, H. S., Wilkinson, K. D., and Ploegh, H. L. (2001) A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *EMBO J* 20, 5187-5196.
94. Vasilescu, J., Zweitzig, D. R., Denis, N. J., Smith, J. C., Ethier, M., Haines, D. S., and Figeys, D. (2007) The proteomic reactor facilitates the analysis of affinity-purified proteins by mass spectrometry: application for identifying ubiquitinated proteins in human cells. *J Proteome Res* 6, 298-305.
95. Costa, A., and Onesti, S. (2008) The MCM complex: (just) a replicative helicase? *Biochem Soc Trans* 36, 136-140.
96. Marcantonio, M., Trost, M., Courcelles, M., Desjardins, M., and Thibault, P. (2008) Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages. *Mol Cell Proteomics* 7, 645-660.
97. Nielsen, M. L., Vermeulen, M., Bonaldi, T., Cox, J., Moroder, L., and Mann, M. (2008) Iodoacetamide-induced artifact mimics ubiquitination in mass spectrometry. *Nat Methods* 5, 459-460.
98. Jivotovskaya, A. V., Valasek, L., Hinnebusch, A. G., and Nielsen, K. H. (2006) Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. *Mol Cell Biol* 26, 1355-1372.
99. Wang, X., Chen, C. F., Baker, P. R., Chen, P. L., Kaiser, P., and Huang, L. (2007) Mass Spectrometric Characterization of the Affinity-Purified Human 26S Proteasome Complex. *Biochemistry*.

100. Catic, A., Collins, C., Church, G. M., and Ploegh, H. L. (2004) Preferred in vivo ubiquitination sites. *Bioinformatics* 20, 3302-3307.
101. Mayor, T., Graumann, J., Bryan, J., Maccoss, M. J., and Deshaies, R. J. (2007) Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the rpn10 receptor pathway. *Mol Cell Proteomics* 6, 1885-1895.
102. Kim, T. S., Jang, C. Y., Kim, H. D., Lee, J. Y., Ahn, B. Y., and Kim, J. (2006) Interaction of Hsp90 with ribosomal proteins protects from ubiquitination and proteasome-dependent degradation. *Mol Biol Cell* 17, 824-833.
103. Bakowska, J. C., Jupille, H., Fatheddin, P., Puertollano, R., and Blackstone, C. (2007) Troyer syndrome protein spartin is mono-ubiquitinated and functions in EGF receptor trafficking. *Mol Biol Cell* 18, 1683-1692.
104. Miyase, S., Tateishi, S., Watanabe, K., Tomita, K., Suzuki, K., Inoue, H., and Yamaizumi, M. (2005) Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem* 280, 515-524.
105. Notenboom, V., Hibbert, R. G., van Rossum-Fikkert, S. E., Olsen, J. V., Mann, M., and Sixma, T. K. (2007) Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification. *Nucleic Acids Res* 35, 5819-5830.
106. Thomas D. Pollard, W. C. E. (2004) *Cell Biology*, Saunders, Philadelphia.
107. Kirkpatrick, D. S., Hathaway, N. A., Hanna, J., Elsasser, S., Rush, J., Finley, D., King, R. W., and Gygi, S. P. (2006) Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol* 8, 700-710.
108. Schnell, J. D., and Hicke, L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278, 35857-35860.
109. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
110. Arrigo, A. P. (2005) [Heat shock proteins as molecular chaperones]. *Med Sci (Paris)* 21, 619-625.
111. Xia, W., and Wolfe, M. S. (2003) Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases. *J Cell Sci* 116, 2839-2844.

112. Akatsuka, Y., Morishima, Y., Kuzushima, K., Kodera, Y., and Takahashi, T. (2007) Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci* 98, 1139-1146.
113. Mann, M., Ong, S. E., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O. N., and Pandey, A. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 20, 261-268.
114. Liao, P. C., Leykam, J., Andrews, P. C., Gage, D. A., and Allison, J. (1994) An approach to locate phosphorylation sites in a phosphoprotein: mass mapping by combining specific enzymatic degradation with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 219, 9-20.
115. Aebersold, R., and Goodlett, D. R. (2001) Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 101, 269-295.
116. Correia, M. A., Sadeghi, S., and Mundo-Paredes, E. (2005) Cytochrome P450 ubiquitination: branding for the proteolytic slaughter? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 439-464.
117. Qu, W., Bradbury, J. A., Tsao, C. C., Maronpot, R., Harry, G. J., Parker, C. E., Davis, L. S., Breyer, M. D., Waalkes, M. P., Falck, J. R., Chen, J., Rosenberg, R. L., and Zeldin, D. C. (2001) Cytochrome P450 CYP2J9, a new mouse arachidonic acid omega-1 hydroxylase predominantly expressed in brain. *J Biol Chem* 276, 25467-25479.
118. Heinemann, F. S., and Ozols, J. (2003) Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68, 123-133.
119. Mziaut, H., Korza, G., Benraiss, A., and Ozols, J. (2002) Selective mutagenesis of lysyl residues leads to a stable and active form of delta 9 stearoyl-CoA desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1583, 45-52.
120. Ferrari, S. (2006) Protein kinases controlling the onset of mitosis. *Cell Mol Life Sci* 63, 781-795.
121. Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
122. Vyas, J. M., Van der Veen, A. G., and Ploegh, H. L. (2008) The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.
123. Linder, P. (2006) Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* 34, 4168-4180.

124. Riera, L., Obach, M., Navarro-Sabate, A., Duran, J., Perales, J. C., Vinals, F., Rosa, J. L., Ventura, F., and Bartrons, R. (2003) Regulation of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway during myogenic C2C12 cell differentiation. *FEBS Lett* 550, 23-29.